

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK ANJİOGENİK ÖZELLİKTE
BİYOMALZEME GELİŞTİRİLMESİ**

Ekin AYTEKİN

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2022**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK ANJİOGENİK ÖZELLİKTE BİYOMALZEME GELİŞTİRİLMESİ

Ekin AYTEKİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Bu tez çalışmasında, doku mühendisliği uygulamalarına yönelik pro-anjiyogenik özellikte sığır kemik deselülerize matriks (DKM) hidrojeli ve biyoaktif cam (BAC) kompozitleri geliştirildi. Bu kapsamda sığır süngerimsi kemik dokusu, hücrelerinden arındırılarak DKM yapısı elde edildi. Deselülerizasyon etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla DNA, sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) ve kolajen içeriği analiz edildi. Ardından DKM yapılarına pepsin aracılı enzimatik sindirim ve nötralizasyon işlemleri uygulanarak fiziksel çapraz bağlanma sonrası nihai DKM hidrojel formunda biyomalzeme üretimi sağlandı. Kompozit biyomalzeme geliştirilmesi kapsamında BAC mikropartikülleri sol-jel yöntemi ile kimyasal olarak sentezlendi. Sentezlenen BAC malzemenin molekül yapısı, x-ışını kırınım spektroskopisi (XRD) ile, kimyasal bileşenleri ise Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile analiz edildi. BAC mikropartikülleri %10 ve %20 oranlarında DKM hidrojeline eklenerek kompozitleri oluşturuldu. DKM hidrojeli ve DKM/BAC kompozitlerinin morfolojik (taramalı elektron mikroskopisi, SEM), kimyasal (enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi, EDS ve FTIR), termal (termogravimetrik analiz, TGA), fiziksel (su tutma), *in vitro* biyolojik özellikleri (biyoaktivite, sitotoksosite, hemoliz) karakterizasyon çalışmaları ile analiz edildi. Biyomalzemelere ait anjiyogenik özelliğin belirlenmesine yönelik olarak *ex vivo* Tavuk Aortik Halka (TAH) ve *ex ovo* embriyonik tavuk Koryoallantoik Membran (KAM) çalışmaları gerçekleştirildi. Geliştirilen biyomalzemelerin KAM ile ilişkili olarak kemikleşmeye katkısını incelemek amacıyla Osteogenez Çalışması yürütüldü. Bu çalışmaların sonuçları ImageJ ve AngioTool yazılımları kullanılarak kantitatif olarak analiz edildi. Çalışma bulguları geliştirilen DKM hidrojeli ve DKM/BAC kompozitlerinin doku ve hücreler için uygun fiziksel, kimyasal ve biyolojik koşulları sağladığını gösterdi. Biyomalzemelere ait *ex vivo* ve *in vivo* bulgular, sağlanan koşulları destekler nitelikte pro-anjiyogenik özellik sergilediklerini ortaya koydu. Geliştirilen DKM+%20 BAC kompozitinin, gruplar arasında anjiyogenik özellik bakımından öne çıktığı belirlendi.

Ocak 2022, 105 sayfa

Anahtar Kelimeler: anjiyogenik biyomalzeme, kemik deselülerize matriksi, biyoaktif cam, kompozit hidrojel, *ex vivo* aortik halka modeli, *ex ovo* koryoallantoik membran modeli

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT OF AN ANGIOGENIC BIOMATERIAL FOR TISSUE ENGINEERING

Ekin AYTEKİN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Yaşar Murat ELÇİN

In this thesis, pro-angiogenic bovine decellularized bone matrix (DBM) hydrogel and bioactive glass (BG) composites for tissue engineering applications were developed. In this context, bovine cancellous bone tissue was purified from its cells and the DBM composition was obtained. To evaluate the decellularization efficiency, DNA, sulfated glycosaminoglycan (sGAG) and collagen contents were analyzed. Then, pepsin-mediated enzymatic digestion and neutralization processes were applied to the DBM structures, resulting in the final DBM hydrogel biomaterial after physical crosslinking. Within the scope of the development of composite biomaterials, BG microparticles were chemically synthesized by sol-gel method. The molecular structure (by X-ray diffraction spectroscopy, XRD) and chemical composition (by Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) of the synthesized BG material were analyzed. Composites were formed by incorporating BG microparticles to the DBM hydrogel at 10% and 20%. Morphological (scanning electron microscopy, SEM), chemical (energy-dispersive x-ray spectroscopy, EDS, FTIR), thermal (thermogravimetric analysis, TGA), physical (water retention), *in vitro* biological (bioactivity, cytotoxicity, hemolysis) properties were evaluated by characterization studies. *Ex vivo* Chick Aortic Ring and *ex ovo* Chorioallantoic Membrane (CAM) of chick embryo assays were performed to analyze the angiogenic properties of the formed biomaterials. An Osteogenesis study was carried out to examine the contribution of the developed biomaterials to ossification in relation to CAM. The results of the related studies were quantitatively analyzed using ImageJ and AngioTool softwares. The findings of the study revealed that the developed DBM hydrogel and DBM/BG composites provide suitable physical, chemical and biological conditions for tissues and cells. *Ex vivo* and *in vivo* findings indicated that the biomaterials exhibited pro-angiogenic properties that support the conditions provided. It was determined that the developed DBM+20% BAC composite stood out among the groups in terms of angiogenic properties.

January 2022, 105 pages

Key words: angiogenic biomaterials, decellularized bone matrix, bioactive glass, composite hydrogel, *ex vivo* aortic ring model, *ex ovo* chorioallantoic membrane model

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması kapsamında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek bana yol gösteren, yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Y. Murat Elçin'e teşekkür ederim.

Yapılan araştırmaların biyolojik karakterizasyonları başta olmak üzere her konuda bana yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. A. Eser Elçin'e ve tüm bu süreç boyunca destek veren Dr. Murat Taner Vurat başta olmak üzere tüm laboratuvar üyelerine çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, beni koşulsuzca sevdiklerini bildiğim maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Hakika Aytekin ve ablam İlknur Hatice Gümüşlü'ye, hayattaki duruşu, dünya görüşü ve fedakarlığını örnek aldığım rahmetli eniştem Doç.Dr. Abdülhamit Gümüşlü'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK BİDEB 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

Ekin AYTEKİN

Ankara, Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1 Doku Mühendisliği	4
2.2 Doku Mühendisliğinde Yapı İskelesi ve Biyomalzemeler	5
2.2.1 Doğal biyomalzemeler	5
2.2.2 Sentetik biyomalzemeler	6
2.2.2.1 Sentetik polimerler	7
2.2.2.2 Seramikler	7
2.2.2.3 Biyoaktif camlar	7
2.3 Anjiyogenez	9
2.4 Doku Mühendisliğinde Anjiyogenezin Önemi	10
2.5 Doku Mühendisliğinde Anjiyogenik Yapı İskelelerinin Geliştirilmesine Yönelik Yöntemler	11
2.5.1 Prevaskülerizasyon	12
2.5.2 Yapı iskelesi modifikasyonları	13
2.6 Anjiyogenik Biyomalzemeler	15
2.7 Biyomalzemelerin Anjiyogenik Özelliklerinin Belirlenmesi	16
2.8 Kaynak Özetleri	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	31

3.1 Materyal	31
3.2 Yöntem	34
3.2.1 Demineralize ve deselülerize kemik matriks (DKM) üretimi	34
3.2.2 DKM karakterizasyonu	36
3.2.2.1 DNA içeriğinin belirlenmesi	36
3.2.2.2 Sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) içeriğinin belirlenmesi	37
3.2.2.3 Kolajen içeriğinin belirlenmesi	38
3.2.3 DKM hidrojel üretimi	38
3.2.4 Sol-jel yöntemi ile 45S5 biyoaktif cam (BAC) sentezi	39
3.2.5 BAC karakterizasyonu	40
3.2.5.1 X-ışınları kırınımı (XRD) analizi	40
3.2.5.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizi	40
3.2.6 DKM hidrojeli ve BAC kompozitlerinin oluşturulması	40
3.2.7 DKM hidrojeli ve BAC kompozitlerinin karakterizasyonu	41
3.2.7.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağılımlı X-ışını spektrometresi (EDS) analizi	41
3.2.7.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizi	41
3.2.7.3 Termogravimetrik analiz (TGA)	41
3.2.7.4 Su tutma analizi	42
3.2.8 DKM hidrojeli ve BAC kompozitlerinin <i>in vitro</i> testleri	42
3.2.8.1 <i>İn vitro</i> biyoaktivite testi	42
3.2.8.2 Hücre kültürü	43
3.2.8.3 Sitotoksite testi	43
3.2.8.4 Hemoliz (Kan uyumluluğu) testi	45
3.2.9 <i>Ex vivo</i> embriyonik tavuk aortik halka (TAH) çalışması	45
3.2.10 <i>Ex ovo</i> tavuk embriyonik koryoallantoik membran (KAM) çalışması	48
3.2.10.1 Anjiyogenik özelliklerin belirlenmesine yönelik analizler	51
3.2.10.2 Histokimya analizleri	52
3.2.10.2.1 Hematoksilen ve eozin (H&E) boyaması	53
3.2.11 Osteogenez çalışması	53

3.2.11.1 Osifiye alan analizi	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	56
4.1 DKM Karakterizasyon Bulguları	56
4.1.1 DNA içeriğinin belirlenmesi	56
4.1.2 sGAG miktarının belirlenmesi	56
4.1.3 Kolajen analizi	57
4.2 BAC Karakterizasyon Bulguları	58
4.2.1 XRD analizi bulguları	58
4.2.2 FTIR analizi bulguları	59
4.3 DKM Hidrojel ve BAC Kompozitlerinin Karakterizasyon Bulguları	60
4.3.1 SEM ve EDS analizi	60
4.3.2 FTIR analizi	62
4.3.3 TGA bulguları	63
4.3.4 Su tutma analizi	64
4.4 DKM Hidrojel ve BAC Kompozitlerinin <i>In vitro</i> Test Bulguları	65
4.4.1 Biyoaktivite testi	65
4.4.2 Sitotoksosite testi	68
4.4.3 Hemoliz (Kan uyumluluğu) testi	70
4.5 <i>Ex vivo</i> Embriyonik TAH Çalışması Bulguları	71
4.6 <i>Ex ovo</i> KAM Çalışması Anjiyogenik Özelliklerin Belirlenmesine Yönelik Bulgular	74
4.6.1 <i>Ex ovo</i> KAM çalışması histolojik bulguları	77
4.7 Osteogenez Çalışması Bulguları	79
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	81
KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ	105

SİMGELER DİZİNİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Kalsiyum nitrat tetrahidrat
CH_3OH	Metanol
CHCl_3	Kloroform
CO_2	Karbondioksit
HCl	Hidroklorik asit
HNO_3	Nitrik asit
NaCl	Sodyum klorür
NaNO_3	Sodyum nitrat
NaOH	Sodyum hidroksit
$^\circ\text{C}$	Santigrat
TEOS	Tetraetil Ortosilikat
TEP	Trietil Fosfat

Kısaltmalar

ASTM	Amerikan Test ve Materyaller Derneği
BAC	Biyoaktif Cam
bFGF	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
CD31	Trombosit Endotelyal Hücre Adezyon Molekülü-1
DKM	Deselülerize Kemik Matriksi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMMB	Dimetilen Mavisi
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ECM	Hücre Dışı Matriks (Ekstraselüler matriks)
EDS	Enerji Dağılımlı X-ışını Spektrometresi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit

EG	Embriyonik Gelişim
EPH	Endotel Progenitör Hücre
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
H&E	Hematoksilen-Eozin
HA	Hidroksiapatit
HDMEC	İnsan Dermal Mikrovasküler Endotelial Hücreleri
HFIP	Hekzafloroizopropanol
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HIF1A	Hipoksi İle İndüklenebilir Faktör 1-Alfa
HIF	Hipoksi ile İndüklenebilir Transkripsiyon Faktörü
HUVEC	İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri
KAM	Koryoallantoik Membran
L1IG6	Hücre Adezyon Molekülü L1'in Altıncı İmmünoglobülin Benzeri Alanı
MMP	Matriks-Metaloproteinaz
MTT	[3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
REDV	Arjinin-Glutamik Asit-Aspartik Asit-Valin
RGD	Arginin-Glisin-Aspartik Asit
SBF	Simüle Edilmiş Vücut Sıvısı
SEM	Taramalı (Scanning) Elektron Mikroskopisi
sGAG	Sülfatlanmış Glikozaminoglikan
TAH	Tavuk Aortik Halka
TGA	Termogravimetrik Analiz
TGFB	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
XRD	X-Işını Kırınımı
YIGSR	Tirozin-İzolösin-Glisin-Serin-Arjinin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Anjiyogenez sürecinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.2 <i>In vivo</i> vaskülerize dokularda difüzyon ve taşıma işlemlerinin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.3 Anjiyogenik süreçlerin uyarılmasıyla vaskülerizasyonu indüklemek için kullanılan hücre temelli yöntemler.....	12
Şekil 2.4 Kemikten ECM hidrojel üretimi genel görünümü. A. Parçalanmış sığır süngerimsi kemik dokusu. B. Demineralizasyon, lipit uzaklaştırma ve deselülerizasyon işlemleri sonrası kemik dokusunun görünümü. C. Enzimatik sindirim ile çözündürülen jel formu görünümü.....	19
Şekil 2.5 Kemik matriks yapılarının (A) demineralizasyon (B) deselülerizasyon sonrası H&E boyaması görüntüleri. (C) DNA miktarı tayini.....	20
Şekil 2.6 Kolajen, demineralize kemik matriksi ve deselülerize kemik matriksinin fare primer kalvariye hücreleri üzerinde proliferatif etkinliği.....	20
Şekil 2.7 (A, C, E) Hücreleştirilmiş trabeküler kemik iskelesi ve (B, D, F) Nano-BAC kaplı kemik iskelesinin çeşitli büyütmelerde SEM görüntüleri.....	21
Şekil 2.8 (Sol) 2, 4 ve 8 haftalık implantasyon sürelerinde kaplanmamış ve n-BAC kaplanmış kemik iskelelerinde endotelyal belirteç Faktör VIII (kahverengi kromojen) ile immüno-lokalize yeni kan damarlarının görüntüsü. (Sağ) 2, 4 ve 8 haftalık implantasyon sürelerinde kaplanmamış ve n-BAC kaplanmış kemik iskelelerinde a-düz kas aktin (kahverengi kromojen) ile immüno-lokalize olgun kan damarlarının görüntüsü.....	22
Şekil 2.9 Yedi gün süre ile SBF'ye daldırıldıktan sonra jelden türetilen 45S5 cam seramik SEM görüntüsü ve Ca/P oranı: (a) ve (b) 40°C'de 3 gün yaşlandırılan numuneler; (c) ve (d) 60°C'de 3 gün yaşlandırılmış numunelere aittir.....	23
Şekil 2.10 0, 1, 7 ve 14 gün süre ile SBF'ye daldırıldıktan sonra, eriyikten türetilmiş 45S5 Bioglass® ve jelden türetilmiş 60°C'de 3 gün yaşlandırılan 45S5 cam seramiğin FTIR spektrumları.....	24
Şekil 2.11 İmmünofloresan boyama sonrası CD31 ifadesi.....	25
Şekil 2.12 Belirtilen günlerde ilgili biyomalzeme ve kontrol grubunun <i>in vivo</i> yara iyileşmesine ait görüntüler.....	26
Şekil 2.13 Fiji yazılımı (ImageJ) kullanılarak bir embriyolu tavuk yumurtası koriyoallantoik membranında iskelelerin anjiyogenez üzerindeki etkisini analiz etmek için kullanılan yöntem.....	27
Şekil 2.14 Embriyolu tavuk yumurtası <i>ex ovo</i> modelinde iskelelerin anjiyogenez üzerindeki etkisi.....	28

Şekil 2.15 Farklı katalizör koşullarında sentezlenen biyoaktif camların SBF daldırma işlemi sonrası görüntüleri.....	29
Şekil 2.16 (a) Çeşitli biyoaktif cam konsantrasyonları için hemoliz yüzdesi. (b) Pozitif (+) ve negatif (-) kontrolün resimli temsili; Çeşitli konsantrasyonlarda kan uyumluluğu analizine ait temsili görseller (c) BG-HCl ve (d) BG-HNO ₃	30
Şekil 3.1 Demineralize kemik dokusu üretim aşamalarının genel seyri.....	35
Şekil 3.2 DKM dokusundan jel oluşturma şeması.....	36
Şekil 3.3 İnkübasyon sonrası DKM hidrojel görünümü.....	39
Şekil 3.4 Embriyodan aortik yapıların eksplantasyonu. (A) Ventral pozisyonda embriyo kalp ve aortik uzantıların genel görünümü. (B) Kalp ve aortik uzantılar. (C) İkili ve üçlü aortik uzantılar.....	47
Şekil 3.5 TAH çalışmasında alınan görüntülere ImageJ yazılımı ile analiz için uygulanan işlemler.....	48
Şekil 3.6 Embriyolu tavuk yumurtası ex ovo modeli.....	49
Şekil 3.7 Embriyonun 7 ve 9. günlerinde genel görünümü ve ilgili biyomalzemenin implantasyonu.....	50
Şekil 3.8 Embriyonik gelişim günlerinin genel gösterimi.....	50
Şekil 3.9 İlgili KAM dokusu ve biyomalzemeye ait görüntülerin işlenme basamakları ve genel görünimleri.....	52
Şekil 3.10 Boyama yapılan arka uzuvlara uygulanan işlemler.....	55
Şekil 4.1 Sol-jel yöntemi ile sentezlenen 45S5 Biyoaktif cam partiküllerine ait XRD spektrumu.....	58
Şekil 4.2 45S5 Biyoaktif cama ait FTIR spektrumu.(▲: Si-O-Si, ■: P-O, ●: Si-O-NBO titreşim modlarını göstermektedir).....	59
Şekil 4.3 Liyofilize DKM ve kompozitlerine ait 50x ve 100x büyütme SEM görüntüleri.....	61
Şekil 4.4 EDS analizi sonuçlarında kalsiyum ve fosfor elementlerine ait atomik yüzdelerin gruplara göre değişimi.....	62
Şekil 4.5 DKM ve DKM/BAC kompozitlerine ait FTIR spektrumları.....	63
Şekil 4.6 DKM, DKM +%10 BAC ve DKM +%20 BAC örneklerine ait termogravimetrik analiz sonuçları.....	64
Şekil 4.7 DKM, DKM +%10 BAC ve DKM +%20 BAC yüzde su tutma grafiği.....	64
Şekil 4.8 1, 7 ve 14 gün SBF’de bekletilen malzemelere ait 500x büyütme SEM görüntüleri.....	66

Şekil 4.9 EDS analizi ile belirlenen Ca ve P atomik yüzdelерinin SBF maruziyet sürelerine göre gruptaki değişimi.....	67
Şekil 4.10 EDS analizi ile belirlenen Si atomu yüzdesinin SBF maruziyet sürelerine göre gruptaki değişimi.....	68
Şekil 4.11 Deney ve kontrol gruplarının MTT boyaması ile birlikte tetrazolyum tuzunun mor renkli formazan kristaline dönüşümü sonrası faz kontrast mikroskobu görüntüleri. DKM hidrojel (A), DKM+%10 BAC (B), DKM+%20 BAC (C), %10 BAC (D), %20 BAC (E), negatif kontrol (F), pozitif kontrol (G) örnekleri. Boyut çubuğu: 250 µm.....	69
Şekil 4.12 Deney gruplarının <i>in vitro</i> sitotoksikite testi bulgularına göre %Hücre canlılığı verileri.....	70
Şekil 4.13 (A) Çalışma gruplarının %Hemoliz grafiğı. (B) Gruplara ait %Hemoliz değerleri.....	71
Şekil 4.14 TAH modeli çalışmasında ilgili biyomalzemelere gömülen aortik halkaların ve gelişen endotel filizlerin 5. güne ait fotoğrafları.....	72
Şekil 4.15 TAH Modeli çalışmasında gözlenen endotel filizlere ait işlenmemiş fotoğraflar ve eşik ayarlama işlemi sonrası ölçüm alınan fotoğrafların görünümü.....	73
Şekil 4.16 İlgili gruplara ait endotel hücrelerin filizlenme alanı grafiğı.....	74
Şekil 4.17 A. EG 12'de görüntülenen biyomalzeme ve ilgili KAM dokusu. B. Fotoğrafların analiz sonrası kan damarları ve dallanma noktaları.....	75
Şekil 4.18 Biyomalzemelere ait yüzde damar yoğunluğu grafiğı.....	76
Şekil 4.19 Biyomalzemelere ait yüzde dallanma noktası grafiğı.....	77
Şekil 4.20 KAM dokusundan çıkarılan biyomalzemelere ait kesitlerin H&E boyama sonrası görüntüleri.....	78
Şekil 4.21 İlgili gruplarda Alsiyen mavisi ve Alizarin kırmızı ile boyanan femurlara ait görüntüler.....	80
Şekil 4.22 Osifiye alan yüzdesi grafiğı.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Çeşitli biyoaktif camlara ait bileşimler (Rahaman vd. 2011).....	8
Çizelge 2.2 Anjiyogenez çalışmalarında kullanılan testler (Liu vd. 2017).....	17
Çizelge 3.1 <i>İn vitro</i> sitotoksite testi deney grupları.....	43
Çizelge 4.1 Doğal ve hücreleştirilen kemik dokusuna ait DNA miktarları.....	56
Çizelge 4.2 Doğal kemik dokusu ve hücreleştirilen kemik matriks yapılarının sGAG içeriği.....	57
Çizelge 4.3 Doğal kemik dokusu ve hücreleştirilen kemik matriks yapılarının kolajen içeriği.....	57

1. GİRİŞ

Doku mühendisliği, gün geçtikçe artmakta olan organ ve doku ihtiyacının giderilmesi için alternatif olarak düşünülen; kök hücre, biyomalzeme ve ilaç/ ilaç türevi bileşiklerin kullanımına dayalı doku/organ tasarım ve üretim süreçlerini kapsayan geniş bir araştırma alanıdır. Bahsedilen kök hücre ve ilaç/ilaç türevi bileşiklerin salımı ve aynı zamanda tutulumu için bir yapı iskelesi görevi üstlenen biyomalzemeler doku mühendisliği ürünlerinin başarısını büyük ölçüde etkilemektedir. Son yıllarda içeriği, yapı ve boyut gibi özellikleri geliştirilen çeşitli biyomalzeme türleri, kapasitesi artırılmış yeni doku ikâmelerinin üretiminde ilerlemelere yol açmıştır. Bunun yanı sıra bu biyomalzemelerin pek çoğu doku ve organların karmaşık yapılarına aynı oranda yanıt verememeleri, klinik uygulanabilirliklerini olumsuz yönde etkilemektedir. Doku mühendisliği ürünlerinin klinik uygulamalarına giden yolda karşılaşılan önemli sınırlamalar; üretim ölçek hacminin düşüklüğü, bazal membranın hücre dışı matriks bileşimi ve dinamiğini yetersiz veya tam olarak sağlayamaması ve dokunun idâme edebilmesi için gerekli olan vaskülerizasyonun oluşturulamamasıdır.

Neovaskülerizasyon veya vasküler hücre transplantasyon yataklarının oluşturulması ve iskemik dokularda perfüzyonun sağlanabilmesi için yenileyici tıp ve doku mühendisliği uygulamalarına yönelik doku yedeklerinin tasarlanması ana araştırma alanlarından biri durumuna gelmiştir.

Vaskülerizasyon ve ilişkili yeniden şekillenme aşamaları temelde, embriyonik ve sonraki dönemler için anjiyogenik süreçler olarak nitelendirilmektedir. Mevcut vasküler ağlardan yeni damar yapılarının oluşturulması olarak tanımlanan anjiyogenez ise dokuların işlevlerini sürdürebilmesi için yeterli besin ve oksijenin temininde rol oynamaktadır.

Anjiyogenezin teşvik edilmesine yönelik olarak, VEGF, bFGF gibi anjiyogenik büyüme faktörleri, anjiyogenezin erken aşamalarında ifade edilen hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa (HIF1A)'yı uyarabilen çeşitli kimyasal ve terapötik ajanlar, küçük

moleküller, bazı metal iyonları, vb. veya hipoksik şartlandırma yaklaşımları üzerine pek çok araştırma sürdürülmektedir. Bunun yanı sıra anjiyogenik özellikte doku iskelelerinin geliştirilmesi dikkat çekici diğer bir yaklaşımdır. Doku yapı iskelesi materyalleri ile lokal anjiyogenezin sağlanması ve konakçı kılcal damarlarının gelişmekte olan hibrit doku yapısına aşamalı olarak nüfuz etmeyi teşvik etmesi önemli bir husustur. Bu kapsamdaki biyomalzemeler, hücre mikroçevresini taklit etmesi, hücrelerin tutunup kılcal damar öncüllerini üretebilecekleri oluklu, gözenekli yüzeyler oluşturabilmesi ve anjiyogenezi tetiklediği bilinen moleküller ve terapötik ajanların kontrollü/yavaş salımını sağlayabilmesi açısından dikkat çekmektedir.

Biyomalzemeler doğal ve sentetik olmak üzere iki grup altında incelenmektedir. Fakat biyouyumluluk ve mukavemet gibi özelliklerin iyi yansıtılması için doğal ve sentetik malzemelerin bir arada kullanıldığı kompozit yapılar anjiyogeneze gibi karmaşık süreçlerin yansıtılmasında daha avantajlı bir uygulama alanı sunmaktadır. Doğal biyomalzemeler sınıfında incelenen hücre dışı matriks yapıları, içeriğinde bulunan dokuya özgü büyüme faktörleri ve yapısal bileşenler ile hücreler için en uygun seçenek olarak öne çıkmaktadır. Bunun yanı sıra içeriğinde çeşitli iyonik yapılar ihtiva eden ve anjiyogenik faktörlerin salımında rol oynadığı bilinen biyoaktif cam (BAC) malzemeler ilgi çekici sentetik biyomalzemelerdendir. Hücre dışı matriks ve BAC kompozit yapılarının dokulardaki anjiyogenik etkinliğine dair çalışmalar sürdürülmekte ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Kompozit yapıları denenmeyen malzeme bileşimleri ve bunların anjiyogenik aktiviteleri incelenmeye ve aydınlatılmaya açık bir konumdadır.

Bu tez çalışmasında; anjiyogenik özellikte, biyolojik sistemlere uyumlu yapısı sebebiyle deselülerize kemik matriks (DKM) ve BAC kompozit yapıları geliştirilerek; fiziksel, kimyasal ve biyolojik karakterizasyonları yapılmıştır. DKM yapısı hayvansal kaynaklı dokuların hücresizleştirilmesi ve ardından enzimatik olarak parçalanması ile hidrojel formda üretilmiştir. BAC malzeme sol-jel yöntemiyle kimyasal sentez yapılarak üretilmiş ve DKM hidrojel ile kompozit yapılar oluşturulmuştur. Ardından kompozit malzemelerin biyolojik karakterizasyonları için Sitotoksikite ve Kan uyumluluğu analizleri yapılmıştır. Geliştirilen biyomalzemelerin pro-anjiyogenik özelliklerinin belirlenmesinde Tavuk Aortik Halka (TAH) çalışmaları gerçekleştirilmiş ve endotelial

uzantılar analiz edilmiştir. Geliştirilen malzemelerin anjiyogenik özelliklerinin analizi için embriyolu tavuk yumurtası kullanılarak *ex-ovo* Embriyonik Tavuk Koriyoallantoik Membran (KAM) çalışmaları yürütülmüş, sonuçlar çeşitli yazılımlar beraber kullanarak değerlendirilmiştir. Embriyonik Tavuk KAM çalışmasında implante edilen biyomalzemeler ve ilişkili KAM dokusu kesitleri alınarak bunların histolojik analizleri yapılmıştır. Biyomalzemelerin osteogenez üzerine olan etkilerinin incelenmesi amacıyla KAM çalışması sonrası embriyoya ait arka uzuvlar alınarak osifiye alan analizleri gerçekleştirilmiştir.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Doku Mühendisliği

Gelişimsel bozukluklar, kaza ve yaralanmalar gibi çeşitli sebeplere bağlı olarak meydana gelen doku ve organ kaybı ve yetmezliği, tüm dünyada önemli bir sağlık ve aynı zamanda sağlık harcamalarının büyük bir bölümünü oluşturan, maliyetli bir sorundur. Doku ve organ yetmezliği veya kaybında, doku ve organ nakli, cerrahi rekonstrüksiyon, yapay protez implantasyonu, sağ kalımı uzatan mekanik destek cihazları ve ilaç tedavisi uygulanan başlıca tedavi yöntemleridir. Bu gibi yöntemler soruna her ne kadar çözüm sunmuş olsa da, her birinde önemli bir takım sınırlamalar mevcuttur. Örneğin nakil işlemlerinde donör eksikliği ve immünojenik red önemli bir problem iken, mekanik destek cihazlarının doku ve organ işlevini tam olarak yerine getirememesi ve hastalığın ilerlemesini durduramaması belli sınırlamalardandır.

Bu sorunlara farklı bir çözüm arayışı; biyoloji, kimya, mühendislik, tıp, eczacılık ve malzeme bilimi gibi çeşitli disiplinlerin bilgi ve anlayışı ile yapılan öncül çalışmaların ışığında nihayet 1980'li yıllarda 'Doku Mühendisliği' adıyla, yeni bir araştırma alanının gelişmesini sağlamıştır (Vacanti 2006). Doku mühendisliği, çeşitli sebeplerle hasarlı veya kaybedilmiş doku ve organların fonksiyonlarını yerine getirmek, yenilemek ve desteklemek ya da biyolojik olarak yerini alabilecek modeller oluşturmayı, sağlamayı amaçlayan disiplinler arası bir çalışma alanıdır. Bu alanda temel yaklaşım, doku veya organa uygun nitelikte hücre seçimi ve seçilen hücelere destek, tutunma ve çoğalma ortamı sağlayacak biyomalzeme odaklı, belli şartlarda hücre yönelimini etkileyebilen 3 boyutlu bir yapı iskelesinin bir arada kullanılması veya ilaç/ilaç türevi moleküllerin bu yapılara eklenmesidir (Langer ve Vacanti 1993, Khademhosseini ve Langer 2016).

Oluşturulacak olan doku/organ modelinin çeşitli boyut ve şekillerde tasarlanmaya elverişli ve aynı zamanda immünolojik açıdan uyumlu yapılar sağlaması bu yaklaşımın önemli avantajlarındanıdır. Doku mühendisliğinde tasarlanıp, üretilen doku ve organ modellerinin uygulanabilirliği, uygun hücrelerin sağlanması ve beraberinde çoğalıp

farklılaşabilecekleri bir ortam sunan yapı iskelesinin bileşimine bağlıdır. Yapı iskelelerinde, hedeflenen doku ve organ yapılarına uygun nitelikte malzeme seçimi ve bunların hücreler ile olan etkileşimleri bu alanda önemli bir unsurdur.

2.2 Doku Mühendisliğinde Yapı İskelesi ve Biyomalzemeler

Doku mühendisliğinde geliştirilmesi beklenen hedef dokunun başarısı, büyük oranda yapı iskelesi özelliklerine bağlıdır. Yapı iskelesi özellikleri; esas olarak üretimi ve tasarımında, doku özelliklerini yansıtabilecek biyomalzemelerin seçimi ve kullanımıyla ilişkilidir. Dokunun idame ettirilmesi için hücre etkileşimine imkan sağlayarak, hücrelerin tutunup çoğalabilecekleri doğal mikroçevre benzeri ortam sunabilmesi en önemli unsurdur. Bununla beraber yapı iskelesi bileşimi, hücrelere gerekli olan fiziksel ve kimyasal koşulların oluşturulmasına imkan sağlamaktadır. Bu durum, tıpkı doğal süreçlerde olduğu gibi hücre göçü ve farklılaşmasının düzenlenmesi ve aynı zamanda fenotipik özelliklerin korunarak, gerekli bileşiklerin sentezlenmesinin yolunu açmaktadır (Kim vd. 2000).

Temelde üretilen yapı iskele malzemesinde, uygun koşulların sağlanması için beklenen özellikler; biyouyumluluk, biyobozunurluk, gözeneklilik, yüksek yüzey alanı, yapısal mukavemet ve 3 boyutlu şekil olarak sıralanmaktadır. Bu kapsamda kullanılan biyomalzemeler doğal ve sentetik olmak üzere iki grup halinde incelenmektedir (Vats vd. 2003).

2.2.1 Doğal biyomalzemeler

Yapı iskelesi üretiminde doğal biyomalzemeler; sergilediği yüksek biyouyumluluk, doğada bol bulunuşu ve işleme kolaylığı sağlamasıyla doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan doğal biyomalzemeler arasında kolajen, kitosan, aljinat, fibrin, hyaluronan, elastin, laminin ve hyaluronik asit gibi biyopolimerler bulunmaktadır. Bu gibi doğal polimerler hücrelere tutunma, çoğalma ve farklılaşmaları için ihtiyaç duyulan yüzey özellikleri sağlamaktadır (Khang vd. 2006).

Doku ve organların hücrelerinden arındırılması ile elde edilen hücre dışı matriks iskelelerini de doğal biyomalzemeler arasında ele almak mümkündür. Hücre dışı matriks yapılarının eldesi genellikle dokunun hücreliliği, yoğunluğu ve lipid içeriğine bağlı olarak uygun deselülerizasyon yönteminin uygulanmasıyla sağlanmaktadır. Deselülerizasyon yöntemi çeşitli kimyasal, enzimatik ajanlar ve fiziksel tekniklerin kullanımı ile gerçekleştirilebilmektedir (Crapo vd. 2011). Deselülerize matriks iskelelerinin diğer doğal polimerlere göre en büyük avantajı hücrelerin doğal mikroçevresinden köken alması ve buna bağlı olarak doğal hücre dışı matriks yapısındaki sinyalleme işlevleri, mekanik ve uzamsal ipuçlarını barındırmasıdır (Keane ve Badylak 2014, Parmaksiz vd. 2016).

Hücre dışı matriks yapı ve kompozisyonunu iyi yansıtmaları, hidrofilik özellikte olmaları ve bunun yanı sıra etkileştikleri dokularda düşük toksisite ve daha az kronik enflamatuvar aktiviteye sahip olmaları doğal biyomalzemelerin tercih edilmelerinde avantaj sağlarken, mekanik dayanımlarının düşük olması ve fizyolojik koşullar altında hızlı bir şekilde bozunmaları ise dezavantajı olarak gösterilmektedir. Mekanik dayanımın artırılması için çeşitli kimyasal modifikasyonlar ve sentetik polimerler ile kompozit yapıların oluşturulması gibi yaklaşımlar uygulanmaktadır. Bu gibi kompozit yapılar biyopolimerlerin yüksek biyouyumluluğunu yansıtırken aynı zamanda sentetik polimerlerin mekanik mukavemetini de göstermektedir (Perez vd. 2013, Pina vd. 2015).

2.2.2 Sentetik biyomalzemeler

Biyobozunur sentetik biyomalzemeler yüksek saflıkta ve miktarda sentezlenebilmesi, tekrarlanabilirliği bunun yanı sıra istenilen yüzey/hacim özelliklerinin kontrolüne imkan sağlamalarıyla doku mühendisliği uygulamalarında öne çıkan biyomalzeme grubudur. Sentetik biyomalzemeleri sentetik polimerler, seramikler ve biyoaktif camlar olarak sınıflandırmak mümkündür (Boccaccini ve Ma 2014).

2.2.2.1 Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında sergiledikleri biyouyumluluk ve biyobozunurluk davranışı, bunun yanı sıra farklı geometrik yapılara sahip iyi tanımlanmış kimyasal yapılarıyla ilgi gören polimer sınıfıdır. Bu polimerlerden başlıcaları poli (a-hidroksiester) ailesinden Poli (laktik asit) (PLA), Poli (glikolik asit) (PGA), kopolimerleri olan Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve poli (ε-kaprolakton) (PCL)'dur. Bunun dışında poliüretan, politetrafloroetilen (PTFE), poli(N-izopropilakrilamit) de yaygın olarak kullanılan sentetik polimerlerdir. Sertlik, gözeneklilik ve biyobozunurluk özelliklerinin ayarlanmasına imkan sağlayan bu polimerler sert ve yumuşak doku ikamelerinin tasarlanmasında avantaj sağlamaktadır. Sunduğu avantajların yanı sıra, hidrofobik yapıları nedeniyle konak doku entegrasyonu problemleri ve bozunma ürünlerinin dokularda yol açabileceği toksik etki bakımından bir takım sınırlamaları mevcuttur (Gunatillake ve Adhikari 2003, Place vd. 2009).

2.2.2.2 Seramikler

Seramikler biyolojik ve kimyasal olarak inert ve ya inert olmayan yapıları, yüksek korozyon direnci ve basınç dayanımına sahip malzemelerdir. Bununla beraber sergiledikleri düşük toksisite ve doku irritasyonları sebebiyle özellikle sert, hareketli doku ikameleri ve protezleri için ideal malzemeler durumundadırlar. Seramik malzemeler biyoinert (alümina, zirkonya), biyobozunur ve biyoaktif olarak sınıflandırılmaktadırlar (Huang ve Best 2022).

2.2.2.3 Biyoaktif camlar

Biyoaktif camlar; yapısında kalsiyum, sodyum ve fosfor gibi çeşitli iyonlar bulunduran, Si-O-Si ağına sahip 3 boyutlu cam formu silikatlarıdır. Hench vd. (1971) tarafından sentezlenen 45S5 biyoaktif camın (%mol 45 SiO₂-24,5 CaO-24,5 Na₂O-6 P₂O₅) keşfi ile beraber, doku mühendisliği uygulamalarında, özellikle kemik doku yenilenmesi ve

onarımında sıklıkla kullanılmaktadır (Hench 2006). Çeşitli biyoaktif cam ve kompozisyonları **çizelge 2.1**'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Çeşitli biyoaktif camlara ait bileşimler (Rahaman vd. 2011)

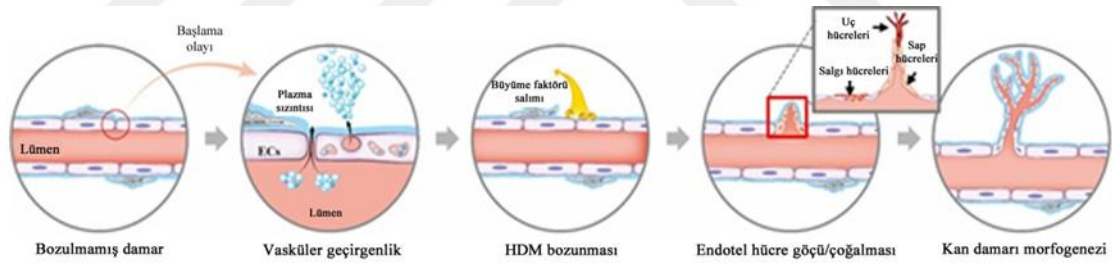
Bileşim (ağırlıkça)	45S5	13-93	6P53B	58S	70S30 C	13- 93B 1	13- 93B3	P₅₀C₃₅N₁₅
Na ₂ O	24,5	6,0	10,3	0	0	5,8	5,5	9,3
K ₂ O	0	12,0	2,8	0	0	11,7	11,1	0
MgO	0	5,0	10,2	0	0	4,9	4,6	0
CaO	24,5	20,0	18,0	32,6	28,6	19,5	18,5	19,7
SiO ₂	45,0	53	52,7	58,2	71,4	34,4	0	0
P ₂ O ₅	6,0	4,0	6,0	9,2	0	3,8	3,7	71,0
B ₂ O ₃	0	0	0	0	0	19,9	56,6	0

Biyoaktif camlar, fizyolojik sıvılarla etkileşime girerek kemikle kuvvetli bağlar oluşturan kemik benzeri, biyolojik olarak aktif hidroksiapatit (HA) tabakasının oluşumunu indüklemekte ve bunun doğal bir sonucu olarak, kemik dokusunun biyolojik etkileşimine ve fiksasyonuna yol açmaktadır. Kemik dokusu ile olan bu bağlanma, materyal yüzeyinde bir takım kimyasal reaksiyonlara ve ardından hücrel etkileşimlerin meydana gelmesine sebebiyet vermektedir. Biyoaktif cam malzeme yüzeyindeki ilgili süreçler iyon filtrasyonu/ değişimi, camla ilişkili yapıların bozunması ve kalsiyumdan yoksun HA yüzey tabakasının çökmesi ve büyümesi ile kendini gösterirken, hücrel reaksiyonlar ise hücrelerin kolonizasyonu, proliferasyonu ve kemik ile ilişkili hücre yapılarının farklılaşması ile gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalar, biyocam malzeme yüzeyinde gerçekleşen ilgili kimyasal reaksiyonların, osteo-genitör hücrelerin gen ekspresyonunun aktivasyonuna ve bunun bir sonucu olarak kemik rejenerasyonuna yol açtığını göstermiştir. Buna ek olarak, biyocamların, VEGF gen ekspresyonunda da etkili olduğu, VEGF salımını ve dokularda vaskülerizasyonu artırdığı yapılan in-vitro ve in- vivo çalışmalarda belirtilmiştir (Day 2005, Gerhardt ve Boccaccini 2010).

Biyoaktif camların VEGF, FGF ve endotelial hücrelerdeki reseptörler gibi proanjyogenik faktörlerin ekspresyonunu artırması ve bununla ilişkili olarak anjiyogenik yolları uyarması yapısında bulunan silikat iyonlarının salımı ve dokularda hipoksik koşulların oluşturulması ile ilişkilendirilmiştir. Silikat iyonlarının anjiyogenik yollarda rol aldığı bilinen HIF1A üzerindeki etkinliğine dair moleküler mekanizmalar tartışılmıştır (Dashnyam vd. 2017).

2.3 Anjiyogenez

Anjiyogenez, farklılaşmış endotelial hücrelerin oluşturduğu ilkel bir vasküler ağdan yeni kılcal kan damarlarının oluşması olarak tanımlanmaktadır. Anjiyogenez ve buna bağlı gerçekleşen vasküler perfüzyon dokuların metabolik aktivitelerinin sağlanması, gelişmesi ve yenilenmesi için oldukça önemli ve zorunlu bir süreçtir (**Şekil 2.1**) (Carmeliet 2005).



Şekil 2.1 Anjiyogenez sürecinin şematik gösterimi (Lee vd. 2021).

Temel görevi dokuya ihtiyaç duyulan oksijen ve besinin sağlanması ve aynı zamanda oluşan metabolik atıkların uzaklaştırılması olan anjiyogenez, bir dizi karmaşık sitokin aracılı uyarının sonucu olarak meydana gelen bir süreç olarak nitelendirilmektedir (Elçin vd. 2001).

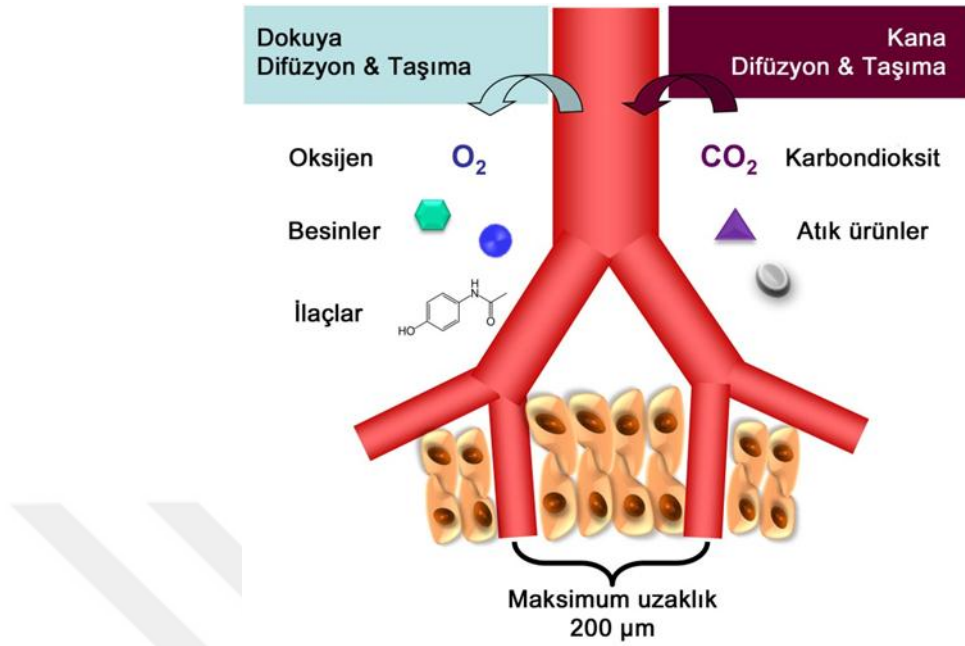
Embriyonik dönemde kan damarı oluşumu vaskülogenez adı verilen, farklılaşmamış öncü hücreler olan anjiyoblastların VEGF, bFGF gibi uyaranlara cevaben, endotelial ve hematopoetik hücrelere farklılaşması ile başlamaktadır. Uterus duvarından sağlanan besin ve oksijen difüzyonu ile kümelenen anjiyoblastlar, iç hücre kümeleri hematopoetik

hücreler ve dış hücre kümeleri endotelial hücreleri oluşturacak şekilde düzenlenmektedir. Daha sonra farklılaşan endotelial hücreler, doku büyümesi ile beraber çoğalarak ilkel vasküler ağların oluşmasına yol açmaktadır. Doku büyümesi oksijen difüzyon sınırına ulaştığında, varolan hipoksik ortam şartlarında ifade edilen hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörleri (HIF) vasküler ağların genişlemesine öncülük etmekte ve sonrasında yapıya perisitler ve düz kas hücrelerinin eklenmesi ile, damar nihai güçlü ve kararlı yapısını kazanmaktadır (Carmeliet 2000, Carmeliet 2003).

Yetişkinlik döneminde ise anjiyogenez yaralanma ve iskemik koşullarda, HIF ifadesi ve bununla beraber VEGF salımının artışıyla endotelial hücrelerin çoğalması ile karakterize edilmiştir. Endotelial hücrelerin aktivasyonu, damar yapısında genişlemeye ve buna bağlı oluşan boşluklardan yeni kılcallar üretmek için geçişine izin vermektedir. Bu işlem aynı zamanda RhoA / Rho kinaz aracılı yollar tarafından yönlendirilen bazal membranın bozunması için matriks-metaloproteinazların (MMP) aktivasyonunu ve bununla beraber HDM proteinleri ile etkileşimi içeren bir süreç olduğu belirtilmiştir (Pugh ve Ratcliffe 2003, van Nieuw Amerongen vd. 2003, Senger ve Davis 2011).

2.4 Doku Mühendisliğinde Anjiyogenezin Önemi

Doku mühendisliği uygulamalarında, yapı iskelesi ve hücre etkileşimi kadar bu yapıların sürdürülebilirliğide önem arz etmektedir. Dokunun gelişimi ve büyümesi, varolan hücrelerin gereksinimleri olan besin ve oksijen alımı ve oluşan atık metabolitlerin uzaklaştırılmasını kapsayan dinamik bir süreçtir (**Şekil 2.2**). Hücresel düzeyde bu süreç difüzyonla sağlanırken, doku düzeyindeki bir gelişim söz konusu olduğunda vasküler ağların oluşumu mecburidir (Laschke vd. 2006).



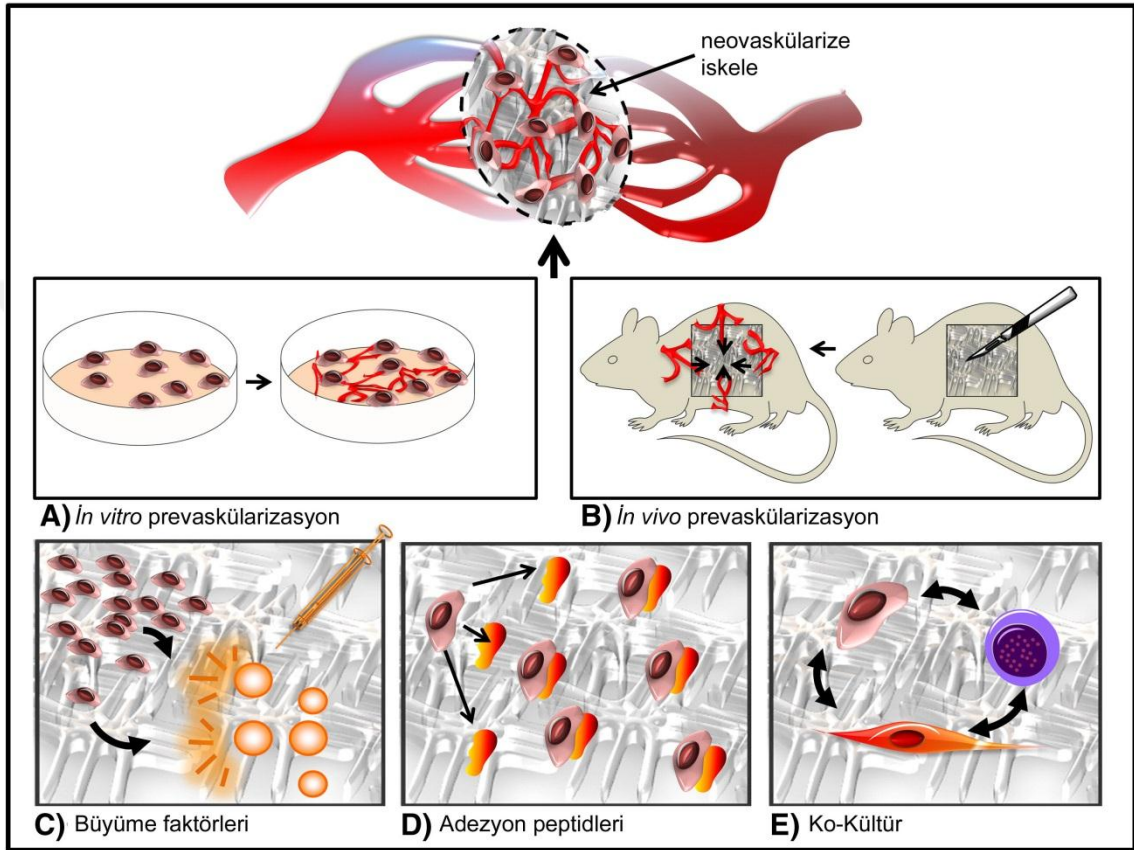
Şekil 2.2 İn vivo vaskülerize dokularda difüzyon ve taşıma işlemlerinin şematik gösterimi (Novosel vd. 2011).

Hücrelerin en yakın kan damarına olan uzaklığı 100-200 µm sınırına ulaştığında sağ kalım için gerekli oksijen difüzyonu tam olarak sağlanamamakta ve bu durum tasarlanan 3B boyutlu doku ikamelerinin başarısını büyük ölçüde sınırlandırmaktadır. Oksijen difüzyonu deri, kornea ve kıkırdak gibi ince veya avasküler dokuların *in vitro* uygulamalarına imkan sağlarken; anjiyogenez eksikliği sinir, kas ve kemik gibi dokular ve organ düzeyindeki karmaşık yapıların geliştirilmesi ve klinik uygulamalarında günümüzde hala aşılması gereken büyük bir problem olarak görülmektedir (Novosel vd. 2011, Mastrullo vd. 2020).

2.5 Doku Mühendisliğinde Anjiyogenik Yapı İskelelerinin Geliştirilmesine Yönelik Yöntemler

Gelişmiş ve başarılı in vitro doku ikameleri oluşturmak için işlevsel vaskülerizasyon ve anjiyogenezin sağlanması dokularda sağ kalım ve sürdürülebilirlik açısından oldukça önemlidir. Oluşturulan doku mühendisliği ürünlerinin klinik uygulamalarında, konak doku penetrasyonu ve buna bağlı vasküler gelişimin sağlanması için çeşitli yaklaşımlar

uygulanmaktadır. Temel amacı doğal neovaskülerizasyon süreçlerini doku mühendisliği uygulamalarında pratik kullanıma aktarmak olan prevaskülerizasyon ve ilişkili bileşiklerin iskele yapılarına modifikasyonu gibi yaklaşımlar bu kapsamda sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 2.3) (Novosel vd. 2011).



Şekil 2.3 Anjiyogenik süreçlerin uyarılmasıyla vaskülerizasyonu indüklemek için kullanılan hücre temelli yöntemler (Novosel vd. 2011).

2.5.1 Prevaskülerizasyon

Prevaskülerizasyon, implante edilen konak doku ile fonksiyonel bütünleşmenin kurulması ve sürecin hızlandırılması amacıyla doku ikamelerinde öncül vasküler ağların oluşturulmasını kapsayan bir uygulamadır. Prevaskülerize doku ikameleri bu amaçla in vitro ve in vivo şartlarda üretilebilmektedir (Laschke ve Menger 2016).

İn vitro prevaskülerizasyon, üretilen yapı iskelelerine endotel hücreler ve/veya miyoblastlar, fibroblastlar gibi çeşitli hücrelerin ekilip *in vitro* ortam şartlarında kültürü esasına dayanan bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımda daha sonra elde edilen 3 boyutlu vaskülerize yapılar iskemik dokuya implante edilerek, konak doku vasküler ağı ile doğal bir bütünleşme olan anastomozun sağlanması hedeflenmektedir. İmplant edilen yapılar ve ihtiva ettiği hücrelerin doku düzeyinde sağ kalımı için zaman kazandıran bir yöntem olmasına rağmen eksik *in vitro* yapıların tam anlamıyla perfüzyona izin vermemesi ve fazla sayıda hücreye ihtiyaç duyulması bu yaklaşım için bir dezavantaj niteliği taşımaktadır (Chen vd. 2014, Paik vd. 2015).

İn vivo presvaskülerizasyon ise hücre içermeyen ve vaskülerize olmayan bir yapı iskele materyalinin konak canlıya implantasyonu sonrası *de novo* vasküler ağların oluşumu sürecini kapsamaktadır. Konaktaki hücrelerin infüzyonu ile doğal sürece bağlı olarak oluşturulan vasküler yapı iskeleleri daha sonra çıkarılarak, ilgili iskemik bölgeye implantasyonu yapılmaktadır. *İn vivo* prevaskülerizasyon işlemi için 3 farklı cerrahi işleme ihtiyaç duyulması ve *in vitro* uygulamada olduğu gibi yavaş perfüzyona sebep olması kullanımını sınırlayan unsurlardandır (Rouwkema vd. 2008).

2.5.2 Yapı iskelesi modifikasyonları

Dokularda neovaskülerizasyonu başlatıcı rol üstlenen anjiyogenik büyüme faktörleri iskele modifikasyonlarında sık tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu amaçla, endotelial progenitör hücrelerin aktivasyonundan sorumlu vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi proteinler hücrelerin kümelenmesini, damar oluşumu ve olgunlaşmasını iyi yönde etkileyerek anjiyogenik uyarımın sağlanması amacıyla kullanılmaktadır. Yine bu gibi büyüme faktörlerine yardımcı trombositlerden türetilmiş büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGFB) ve anjiyopoietin gibi kompleks sitokin yapıların bir arada kullanılması kılcal tüp oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Nomi vd. 2006).

Ancak ilgili büyüme faktörleri dokularda hızla bozunma özelliklerinden dolayı enjeksiyon uygulamalarında sınırlı bir alanda, kısa süreli aktiviteye sebep olmaktadır. Bu durum büyük ölçüde büyüme faktörlerinin protein yapılarının stabilitesini uzun süre koruyamaması ve fizyolojik koşullar altında enzimler tarafından hızla parçalanması ile ilgilidir. Bu durumun üstesinden gelmek amacıyla zamana bağlı olarak bozunan doğal, sentetik ve kompozit biyomalzemelere yükleme yaklaşımı uygulanmaktadır (Wang vd. 2017, Ren vd. 2020).

Yine ilgili anjiyogenik büyüme faktörlerini yüksek düzeyde ifade eden transfekte mezokimal kök hücrelerin biyomalzemeler ile beraber kullanılması da damar gelişimini iyi yönde etkilemiştir (Yang vd. 2007, Laiva vd. 2018).

Bunun yanı sıra, biyomalzemelerin spesifik adezyon peptidleri veya hücre dışı matriks molekülleri ile modifikasyonu anjiyogenezi tetiklemek için kullanılan bir diğer yöntemdir. Fibronektin (örn. RGD ve REDV) veya laminin (örn. YIGSR) gibi hücre dışı matris proteinlerinden türetilen kısa peptitler, L1'in altıncı immünoglobulin benzeri alanı (L1Ig6) gibi proteinler biyomalzemelerde adeziv yüzeylerin oluşturulması için kullanılmaktadır. Bu gibi peptid/protein yapıları endotel hücrelerin seçici olarak çoğalmasını indükleyerek kılcal tüp oluşumuna izin vermektedir (Hall vd. 2004, von der Mark vd. 2010).

Üretilen doku mühendisliği ürünlerinde anjiyogenik aktiviteyi sağlamak için kullanılan diğer bir yöntem ise bu yapılara hücre yükleme yaklaşımıdır. HUVEC'ler ve Dermal mikrovasküler EC'leri (HDMEC'ler) gibi endotel hücre kaynakları bu kapsamda kullanılmakta, fakat düşük proliferasyon özellikleri ve kısıtlı elde edilebilmeleri kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Endotel progenitör hücreler (EPH), olgun endotel hücrelere farklılaşma ve iskemik dokuya göç etme özelliklerinden dolayı daha fazla tercih edilmektedir. Düz kas hücreleri, fibroblastlar, adipositler ve osteoblastlar gibi çeşitli hücre türlerinin endotel hücrelerle ko-kültürü yaklaşımının hücre dinamikleri (iletişim, etkileşim gibi) anjiyogenik uyarımda iyi yönde etkilediği belirtilmiştir (Santos ve Reis 2010, Unger vd. 2015, Sasagawa vd. 2016).

2.6 Anjiyogenik Biyomalzemeler

Başarılı doku yenilenmesi için biyomalzemeler, ilişkili dokuda vaskülerizasyon ve anjiyogeneze izin vermelidir. Bu durum hücrelerin yapı iskelelerinde tutunup, çoğalması ve aynı zamanda matriks bileşenleri üretiminin uyarılmasını da teşvik etmektedir. Doku yenilenmesi ve anjiyogenez arasındaki etkileşim göz önüne alındığında, anjiyogenik olayların teşvik edilmesi ve yeniden vasküler doku oluşumuna izin veren biyomalzemelerin geliştirilmesi önemli bir parametredir (Naderi vd. 2011, Auger vd. 2013).

Bu kapsamda sağlıklı mikro damar sisteminin oluşumunu desteklemek için anjiyogenik biyomalzemelerin üretiminde, suyu tutan ve hücre aktivitesine duyarlı olan doğal veya sentetik polimerler tercih edilmektedir. Bu gibi polimerler üretilirken, tipik olarak hücre dışı matriksin önemli bileşenlerini yeniden özetlemesi esas alınmaktadır. Doğal vasküler nişte hücre dışı matriks, *in vivo* ve *in vitro*da mikro damarların geliştirilmesi için hayati fiziksel ve kimyasal ipuçları sağlarken, sağladığı mekanik destek ile endotelial ve perivasküler hücrelerin canlılığını, göçünü ve morfolojisini düzenleyen sinyal yollarının aktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Crosby ve Zoldan 2019).

Briquez vd. 2016'da incelenen anjiyogenik özelliklerin teşvik edilmesinde biyomalzemeler geliştirilirken dikkate alınması gereken unsurlar;

1) Biyomimetik olmalıdır. (Kullanılacağı çeşitli doku tiplerinin (kalp dokusu, deri, iskelet kası veya kemik gibi) doğal fizyolojik süreci ile tutarlı ve mikroskobik düzeyde, hücrelerin hücre dışı matriks yapısına uygun gözenek mimarisi, yüzey nano/mikro-topolojisi, sertlik, elastikiyet ve viskozite gibi fizikokimyasal özellikleri sağlamalıdır.)

2) Büyüme faktörleri sağlamalıdır. (Matriks bileşenlerinin sağladığı özelliklere ek olarak, pro-anjiyogenik faktörlerinde bu yapılara dahil edilmesi ile ilgili faktörlerin malzeme içinde tutulması ve biyobozunma ile düzenli olarak ilişkili dokuya salımına izin vermelidir.)

3) Hücreler ve büyüme faktörleri arasında sinerji göstermelidir. Pro-Anjiyogenik biyomalzemeye entegre edilen sinyal moleküllerinin (integrinler, proteazlar, büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri ve metalik iyonlar gibi) etkileşiminde doğal proteaz aracılı salımın taklit edilmesi için önemlidir. Biyomalzemelerde salım kinetiği optimize edilerek ilgili moleküllerin doz ve etkinlik özelliklerinin iyileştirilmesi esas alınmalıdır.

Anjiyogenik özellikleri bakımından birçok doğal ve sentetik polimer araştırılmıştır. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan doğal biyomalzemeler arasında hücresizleştirilmiş doğal hücre dışı matriks, fibrin, kolajen, jelatin, aljinat ve dekstran bulunmaktadır (Nosrati vd. 2018). Sentetik olarak ise PGA, PLA, PLGA, PEG gibi polimerler, biyoaktif camlar gibi seramikler ve çeşitli metal iyonları anjiyogenik özelliklerin sağlanmasında kullanılan biyomalzemelerdir (Kargozar vd. 2019).

2.7 Biyomalzemelerin Anjiyogenik Özelliklerinin Belirlenmesi

Anjiyogenez pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörlerin arasındaki denge ile belirlenen, karmaşık hücrel ve moleküler aktiviteler sonucu gerçekleşen doğal bir süreçtir. Anjiyogenezi desteklemek için geliştirilen doku mühendisliği iskeleleri çoğunlukla biyomalzemeler çevresinde şekillenir. Bu kapsamda doku mühendisliği stratejileri, dokularda uygun innervasyon ve vaskülerizasyon koşullarını sağlayabilecek biyomalzemelerin kullanımını içermektedir. Bu koşullu stratejiler bağlamında doğal ve sentetik biyomalzemeler çoğu zaman çeşitli biyoaktif moleküller, proteinler ve hücreler ile birleştirilerek kullanılmaktadır (Saberianpour vd. 2018).

Biyomalzemelerin kullanıldığı farklı bileşimleri içeren bu yapı iskelelerinin anjiyogenik süreçlerdeki rolünü ve etkinliğini anlamak ancak klinik öncesi araştırmalar neticesinde mümkün olabilmektedir. Anjiyogenik süreçlerin karmaşıklığı ve fizyolojik sistemlerin heterojen doğası nedeni ile literatürde birçok anjiyogenez çalışma modeli önerilmektedir. İlgili modeller *in vitro*, *ex vivo* ve *in vivo* testleri kapsamaktadır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Anjiyogenez çalışmalarında kullanılan testler (Liu vd. 2017)

İn vitro Testler	Hücre çoğalması testi, Hücre göçü testi, Tüp oluşturma testi, Mikroçip aracılı mikroakışkan test yaklaşımı
Ex vivo Testler	Aortik Halka Modeli, Fare Metatarsal Modeli
İn vivo Testler	Tavuk Embriyonik Koryoallantoik Membran Modeli, Dorsal Deri Bölmesi Modeli, Kornea Modeli (Micropocket), Matrijel Modeli, Zebrabalık Modeli

Anjiyogenez için potansiyel hedeflerin taranmasında *in vitro* testler, nicelleştirilebilir ve hızlı yöntemlerdir. *İn vitro* testlerin yararlı bulunan bu özellikleri testi yapılan ilaç ve biyomalzemelerin etkinliği hakkında çoğu zaman erken kanıya varılmasına ve neticesinde yanlış yorumlamalara sebep olabilmektedir. Bunun yanısıra *in vivo* fizyolojik koşullar *in vitro* modellerde tam olarak simüle edilemediği için hücre dışı matriks yapılarını ve ko-kültür yaklaşımlarını içeren *in vitro* koşulların oluşturulması önemli bulunmaktadır (Staton vd. 2009).

Çeşitli doku kültürlerini içeren *ex vivo* modeller destekleyici hücresel bileşenleri ve hücre dışı matriks yapısını barındırdığı için *in vitro* modellerin sınırlamalarının üstesinden gelme potansiyeli taşımaktadır. Bununla beraber sıçan ve embriyonik tavuk Aortik Halka Modeli kullanılarak yapılan *ex vivo* modellerin, *in vivo* uygulamaları ile uyumlu sonuçlar sergilediği belirtilmektedir (Nicosia vd. 2005, Mangır vd. 2019).

Fakat *ex vivo* modeller *in vivo* şartlarda gözlenen kan akışından yoksundur ve bu durum özellikle mekanik ve kimyasal mekanizmalar tarafından düzenlenen anjiyogenez ile ilişkili genlerin ifadesini sınırlamaktadır. Bu sebeple *in vivo* modeller ile yapılacak çalışmalarla desteklenmesinin önemli olduğu belirtilmektedir (Laschke vd. 2006, Liu vd. 2017).

İn vivo modeller, dokularda damarlanmayı pozitif veya negatif yönde etkileyen ilaç ve biyomalzemelerin tasarlanması, geliştirilmesi ve değerlendirilmesinde, klinik öncesi çalışmalar kapsamında önemlidir. Keşfedilen yeni bileşiklerin tarama, doz etkinliği,

moleküler yapı aktivitelerinin tayini ve bunun yanısıra birden fazla ajanın birlikte kullanımının etkilerini araştırmak için farklı *in vivo* modellerin kullanımı söz konudur. Bununla birlikte tek bir *in vivo* model kullanımının anjiyogenik özelliklerin incelenmesinde yetersiz olduğu vurgulanmaktadır. Bu büyük ölçüde farklı tür ve özelindeki mikroçevrenin bununla birlikte çalışılan organ, araştırılan ajanın verilmiş yöntemi ve bağışıklık sistemi yanıtları gibi hususların farklılıklarından ileri gelmektedir (Norrby 2006).

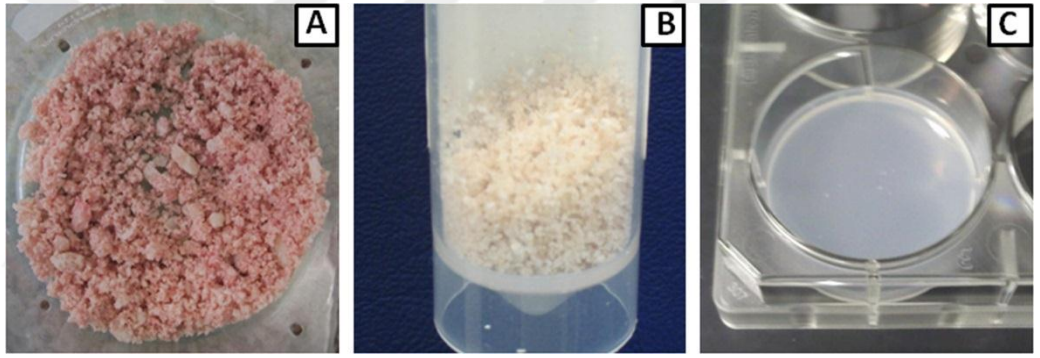
Anjiyogenik etkinin kantitatif ölçümüne imkan sağlayan Embriyonik Tavuk Koryoallantoik Membran (KAM) modeli basit ve tekrarlanabilir olması, kolay erişilebilmesi ve hayvan tesisine ihtiyaç duymaması sebebiyle en çok kullanılan *in vivo* modeller arasındadır. KAM dokusu embriyolarda temelde gaz alışverişinde bir organ görevi üstlenen, yoğun kılcal damar ağına sahip ekstraembriyonik bir membrandır. Gelişen embriyonun üzerinde kalan bu doku, tümör anjiyogenezi, pro ve anti-anjiyogenik etkinin incelenmesi amacıyla geliştirilen ilaç ve biyomalzemelerin incelenmesinde uygun bir platform sunmaktadır. Bununla beraber araştırma amacına uygun olarak, *in ovo* ve *ex ovo* kültürleri yapılabilmektedir. *Ex ovo* KAM modeli anjiyogenik etkinin değerlendirilmesinde geniş bir yüzey alanı sunması ile embriyonun ve damarlanmanın incelenmesine imkan sağlamaktadır (Mangir vd. 2019).

2.8 Kaynak Özetleri

Çeşitli patolojilerin tedavisi ve doku mühendisliği uygulamalarında doğal ve sentetik biyomalzemelerin elde edilmesi ve karakterizasyonu bununla birlikte anjiyogenik teşvikin sağlanmasına yönelik üretilen biyomalzemelere ait literatürde yer bulan bazı çalışmalar incelenmiştir.

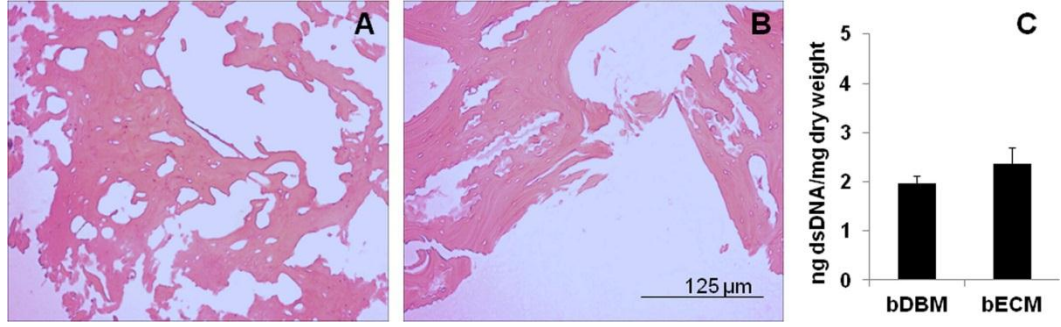
Sawkins vd. (2013) yaptıkları çalışmada, kemik doku yenilenmesini teşvik etmek için homolog doku türevli çözünebilir hücre dışı matriks materyali geliştirmişlerdir. Bu amaçla, 12-24 aylık sığır femur kemiklerinden elde edilen süngerimsi kemik dokusu, küçük parçalara ayrılarak 0.5 N HCl asit muamelesi ile kemik dokusunun

demineralizasyonu sağlanmıştır (**şekil 2.4 A**). Ardından elde edilen demineralize dokulardaki lipidlerin uzaklaştırılması için 1:1 metanol/kloroform karışımında çalkalanmış ve dondurularak liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen malzeme, 24 saat süreyle 0.05% tripsin ve 0.02% etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren zeltide 37 °C’de %5 CO₂ ihtiva eden ortamda karıştırılarak, enzimatik hcresizleştirme protokolü uygulanmıştır (**şekil 2.4 B**). Nihai rn %1 Penisilin/Streptomisin içeren PBS içerisinde 24 saat süreyle 4 °C’de çalkalanarak yıkanmış ve ardından dondurularak kurutulmuştur. İşlemler sonunda demineralize ve deselülerize kemik matriks materyaline pepsin ile enzimatik parçalama işlemi uygulanmıştır. Pepsin ztleri daha sonra nötralizasyon ve tuz konsantrasyon ayarlamaları yapılarak 37 °C’de, çözünebilir hidrojel formdaki biyomalzeme elde edilmiştir (**şekil 2.4 C**).



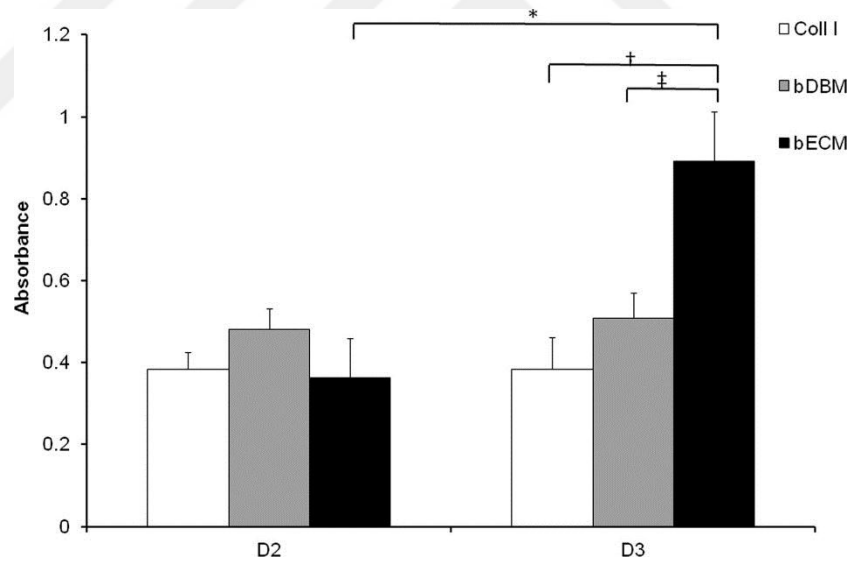
şekil 2.4 Kemikten ECM hidrojel üretimi genel görünümü. A. Parçalanmış sığır süngerimsi kemik dokusu. B. Demineralizasyon, lipid uzaklaştırma ve desellerisasyon işlemleri sonrası kemik dokusunun görünümü. C. Enzimatik sindirim ile çözündürülen jel formu görünümü.

Hücresizleştirilen yapı H&E boyaması yapılarak doğrulanmış (**şekil 2.5 A-B**), demineralize ve deselülerize kemik matriks hidrojelinin DNA miktar tayini (**şekil 2.5 C**) ve kolajen içeriği belirlenmiştir.



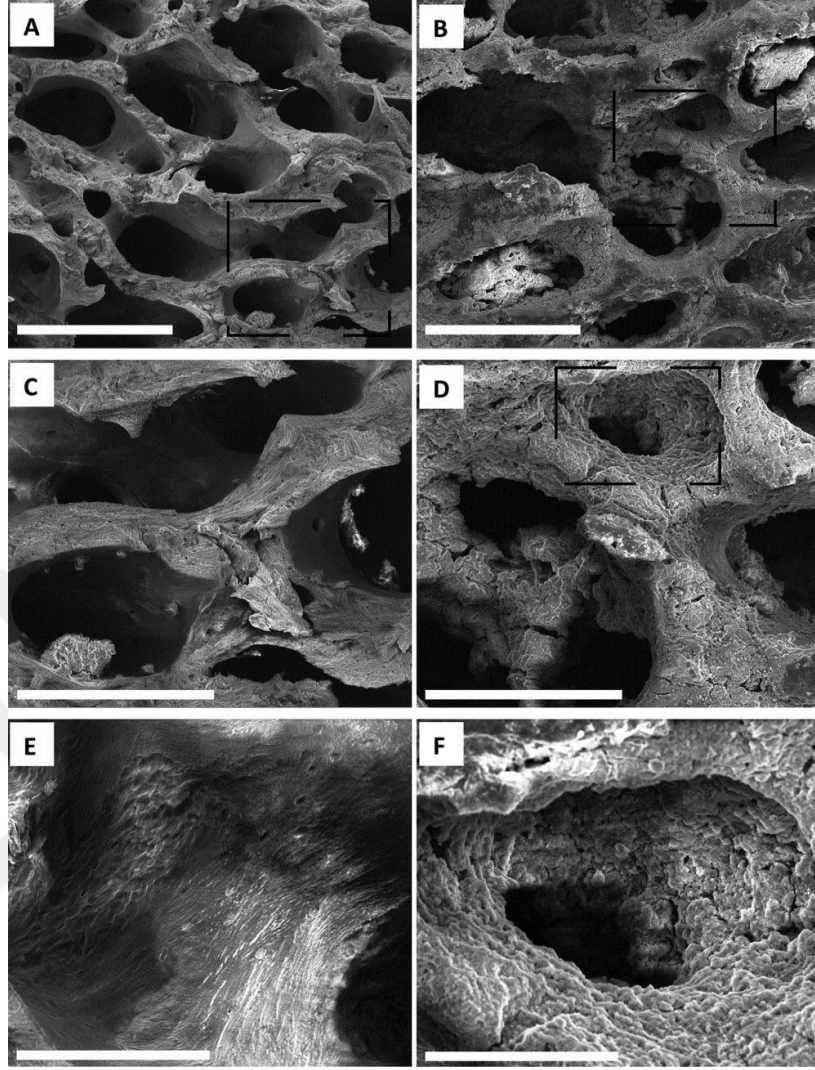
Şekil 2.5 Kemik matriks yapılarının (A) demineralizasyon (B) deselülerizasyon sonrası H&E boyaması görüntüleri. (C) DNA miktarı tayini

Türbidimetrik jelleşme kinetiği, reoloji ve SEM analizleri yapılmıştır. *İn vitro* çalışmalarda ise çoğunlukla osteoblastların oluşturduğu fare primer kalvarial hücreleri kullanılarak hücre canlılığı ve çoğalması değerlendirilerek, proliferatif özellik sergilediği belirtilmiştir (Şekil 2.6).



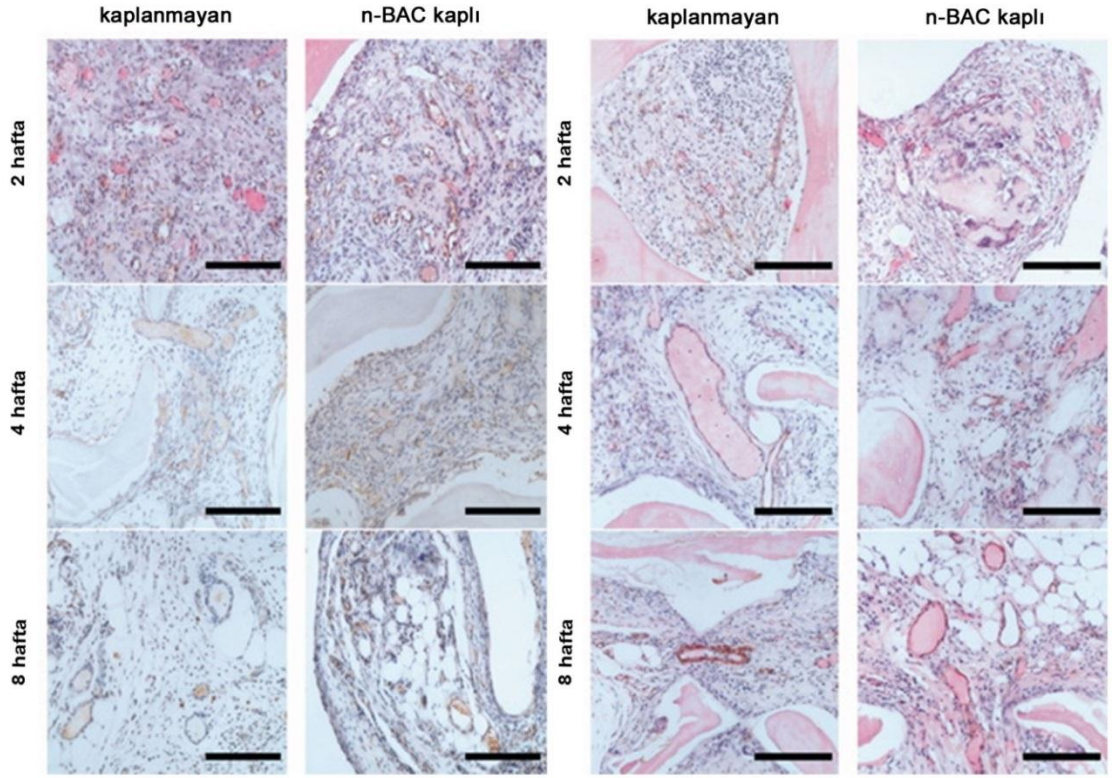
Şekil 2.6 Kolajen, demineralize kemik matriksi ve deselülerize kemik matriksinin fare primer kalvariye hücreleri üzerinde proliferatif etkinliği

Gerhardt vd. (2013) hücreleştirilmiş trabeküler kemik iskelelerini nano BAC ile kaplayarak sıçanlar üzerinde *in vivo* yeniden hücrelendirilme ve neovaskülerizasyonunu incelemiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 (A, C, E) Hücresizleştirilmiş trabeküler kemik iskelesi ve (B, D, F) Nano-BAC kaplı kemik iskelesinin çeşitli büyütmelerde SEM görüntüleri

Nano yapılı BAC ile kaplanan hücresizleştirilmiş kemik iskelesi kaplanmayan gruba göre 4,3 kat daha fazla VEGF salımı ile karakterize edilmiştir. Araştırmacılar, stereolojik analizler sonucunda nano-BAC kaplı ve kaplı olmayan iskelelerin kullanıldığı sıçanlarda yeni doku ve kan damarı oluşumunun gerçekleştiğini fakat aralarında önemli bir fark olmadığı belirtmişlerdir. İmplantasyon sonrası 2, 4 ve 8. haftalarda histoloji ve immünohistokimyasal analizler yapmışlardır (Şekil 2.8).

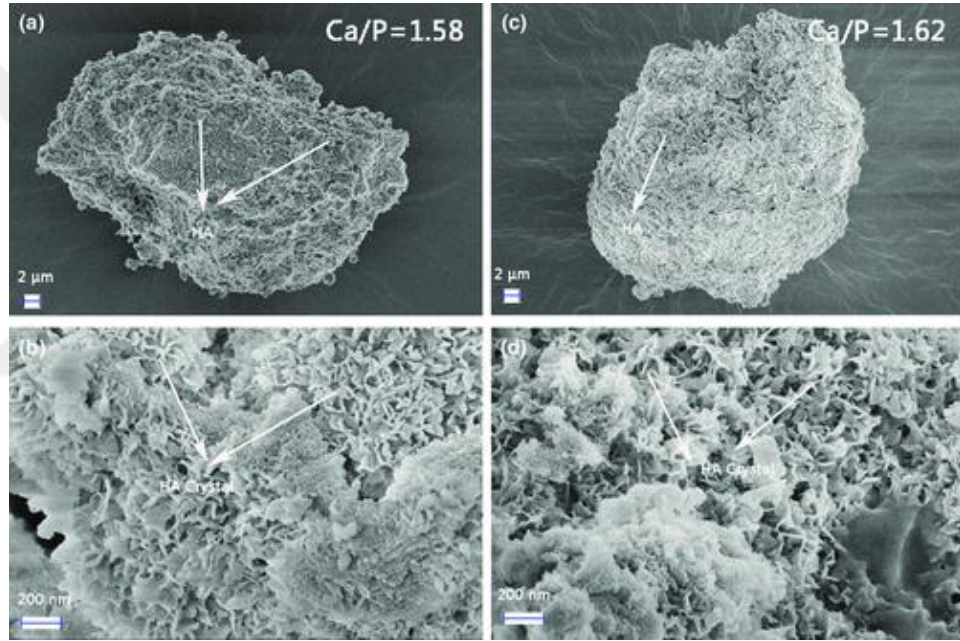


Şekil 2.8 (Sol) 2, 4 ve 8 haftalık implantasyon sürelerinde kaplanmamış ve n-BAC kaplanan kemik iskelelerinde endotelial belirteç Faktör VIII (kahverengi kromagen) ile immüno-lokalize yeni kan damarlarının görüntüsü. (Sağ) 2, 4 ve 8 haftalık implantasyon sürelerinde kaplanmamış ve n-BAC kaplanan kemik iskelelerinde a-düz kas aktin (kahverengi kromagen) ile immüno-lokalize olgun kan damarlarının görüntüsü

Çalışma bulgularına göre hücreleştirilmiş trabeküler kemik matriks gözenek yapısı ve içeriğinde kalan matriks bileşenlerinin tek başına gelişme ve yeniden yapılandırılmayı teşvik edebileceği vurgusu yapılmıştır. Bunun yanı sıra, pro-anjiyogenik etkinliğin nano-BAC kaplı kemik iskelelerinde gözlemlenmediği belirtilen çalışmada, hücreleştirilmiş kemik matrikslerine nano-BAC eklenmesinin osteoindüktif ve osteokondüktif özellikler kazandırma konusunda başarılı olabileceği, karmaşık doku kusurlarında hücrelenme ve neovaskülerizasyonun sağlanmasında klinik potansiyeline dikkat çekilmiştir.

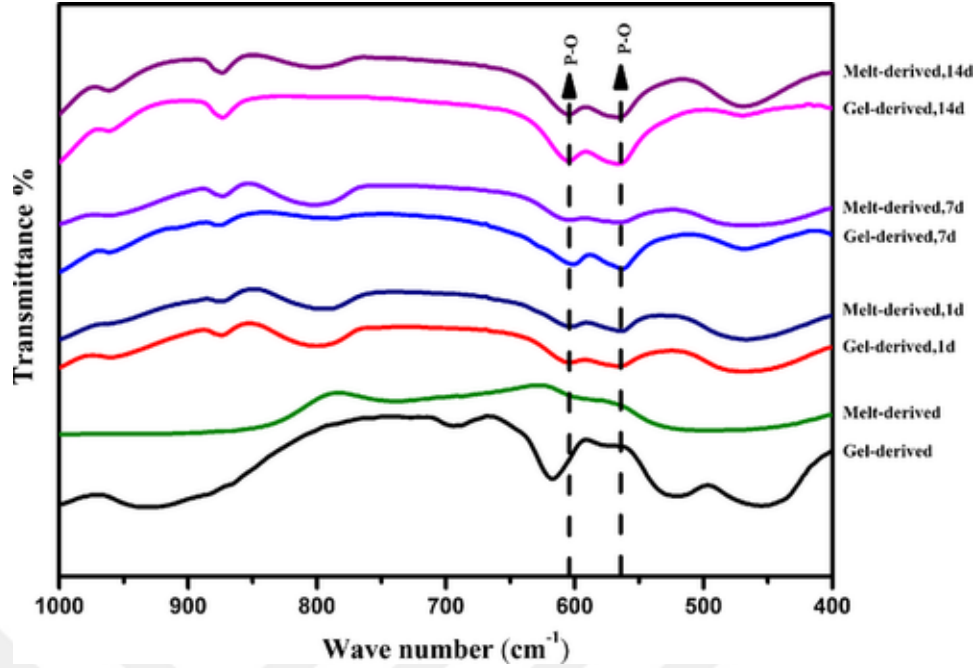
Zheng vd. (2015) çeşitli yaşlandırma zamanları ve sıcaklık koşulları altında sol jel yöntemiyle sentezledikleri 45S5 Biyocam malzemenin sergilediği yapı ve *in vitro*

biyoaktivitesini değerlendirmişlerdir. Biyocam seramik yapısındaki ağların güçlendirilmesi amacıyla sol-jel türevli biyocam malzemeye, 0, 3, 7, 10 ve 15 gün 25°C’de ve ayrı ayrı 25°C, 40°C ve 60°C’de 3 gün olacak şekilde yaşlandırma süre ve sıcaklıkları uygulanmıştır. Daha sonra kurutulan örneklerin, 700 °C’de kararlı hale gelmesi sağlanmıştır. 45S5 Biyocam malzemenin biyoaktivitesini değerlendirmek için SBF’ye (simüle vücut sıvısı) daldırma işlemi uygulanmış SEM ve fonksiyonel grup tayini için FTIR analizi yapılmıştır (**Şekil 2.9**). Araştırmacılar bulgularında yaşlandırma süreleri ve sıcaklık artışının kristalleşmeyi arttırdığı fakat artan yaşlandırma sürelerinin sıcaklıktan bağımsız olarak biyoaktiviteyi azalttığını belirtmişlerdir.



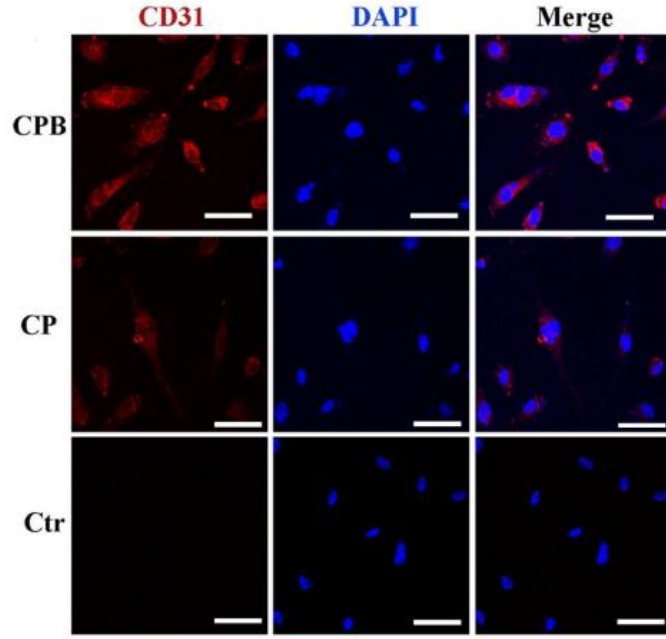
Şekil 2.9 Yedi gün süreyle SBF'ye daldırıldıktan sonra jelden türetilen 45S5 cam seramik SEM görüntüsü ve Ca/P oranı: (a) ve (b) 40°C’de 3 gün yaşlandırılan numuneler; (c) ve (d) 60°C’de 3 gün yaşlandırılmış numunelere aittir

Bunun yanı sıra çalışmada, sentezlenen sol jel türevli 45S5 Biyocam malzeme ticari olarak temin edilebilen amorf 45S5 Biyocam® ile karşılaştırılmıştır. SBF testi sonrası 60 °C’de 3 gün yaşlandırılan grubun amorf 45S5 Biyocam® malzemeye göre hızla HA çökmesi sergilediği ve 14. güne gelindiğinde ise hala karşılaştırılabilir düzeyde biyoaktiviteye sebep olduğu FTIR ve SEM analizleri ile gösterilmiştir (**Şekil 2.10**).



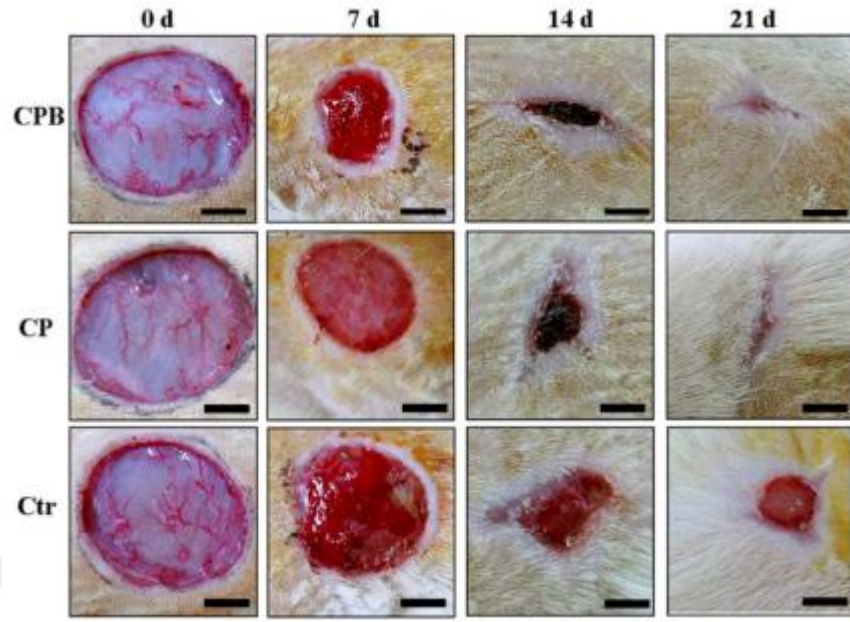
Şekil 2.10 0, 1, 7 ve 14 gün süreyle SBF'ye daldırıldıktan sonra, eriyikten türetilmiş 45S5 Bioglass® ve jelden türetilmiş 60°C'de 3 gün yaşlandırılan 45S5 cam seramiğin FTIR spektrumları

Gao vd. (2017) yaptıkları çalışmada, diyabetik yaralarda doku yenilenmesini artırmak için elektro-eğirme yöntemiyle nanolifli Kolajen/PCL/BAC (mol% 60SiO₂-36CaO-4P₂O₅) ve Kolajen/PCL kompozit yapı iskelesi geliştirmiş ve karşılaştırmalı olarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla incelemişlerdir. Çözelti Kolajen/PCL/BAC 1:1:1 ve Kolajen/PCL 1:1 oranında hekzafloroizopropanol (HFIP) içerisinde 6 saat boyunca karıştırılması ile elde edilmiştir. Elde edilen çözelti 10 ml'lik şırıngaya alınmış, 10 kV voltajda 10 µl/dk hızda elektro-eğirme işlemi uygulanmıştır. Elde edilen nanolifli yapı iskelelerinin, endotelial hücreler kullanılarak hücre canlılığı ve anjiyogenik belirteç CD31 ifadesi belirlenmiştir. CD31 ifadesinin nanolifli Kolajen/PCL/BAC iskeleleri için daha iyi olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.11).



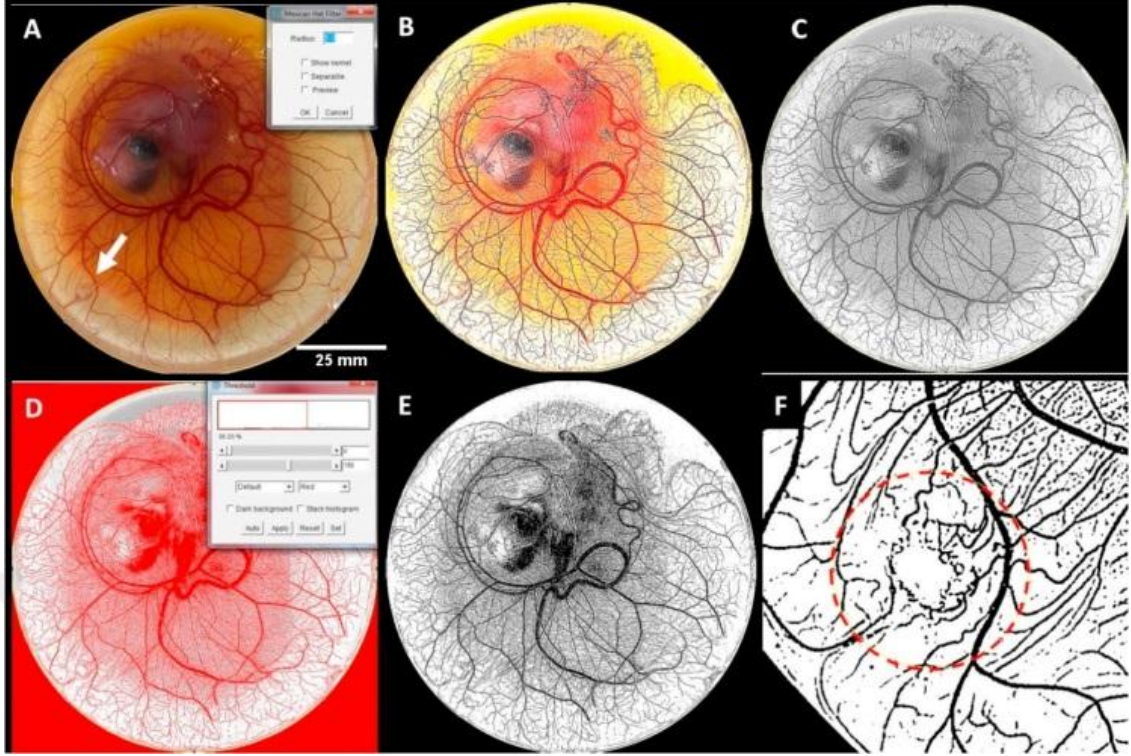
Şekil 2.11 İmmüno Floresan boyama sonrası CD31 ifadesi.

In vivo çalışmalarda diyabetik tam kalınlıktaki yara modeli oluşturulan erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma için sıçanların sırtlarında 2 cm çapında 3 adet tam kalınlıkta yara modeli oluşturulmuş, Kolajen/PCL/BAC, Kolajen/PCL ve tedavi edilmeyen kontrol olmak üzere 3 farklı biçimde uygulama yapılmıştır. 4, 7, 14 ve 21. gün takip süreleri boyunca yara iyileşmesi takibi yapılmıştır. 7, 14 ve 21. günlerde alınan numunelerin histolojik, immünohistokimyasal analizleri yapılmış ve HIF1A, VEGF, Col1 ve α -SMA ifadeleri incelenmiştir. Yara iyileşmesi ve anjiyogenik belirteçlerin nanolifli Kolajen/PCL/BAC biyomalzemelerde daha iyi sonuçlar verdiği belirtilmiştir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 Belirtilen günlerde ilgili biyomalzeme ve kontrol grubunun in vivo yara iyileşmesine ait görüntüler

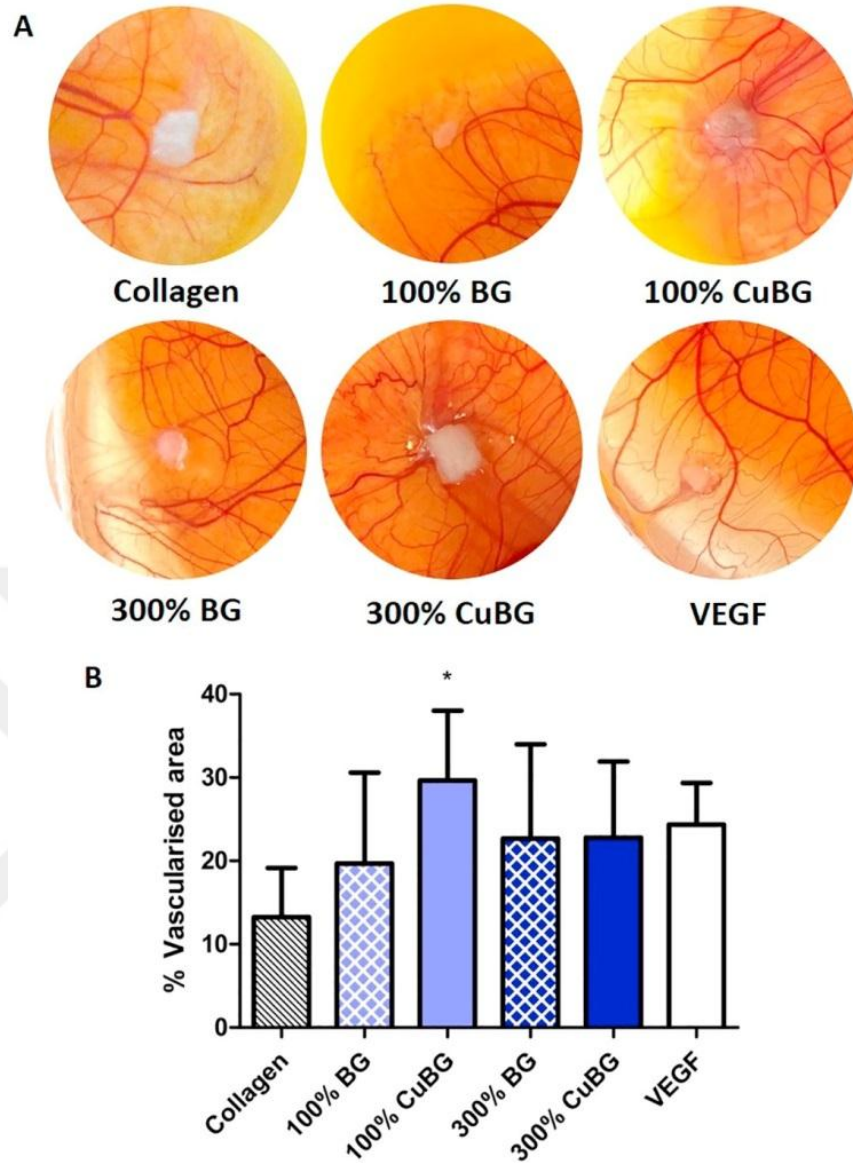
Ryan vd. (2019) geliştirdikleri bakır katkılı Kolajen-Biyoaktif cam kompozit yapılarının antibakteriyal, osteogenik ve anjiyogenik özelliklerini inceledikleri kapsamlı bir çalışma sunmuştur. Anjiyogenik özelliklerin analizinde *ex ovo* Embriyolu Tavuk Yumurtası modeli kullanılan çalışmada, geliştirilen malzemeler embriyonik gelişimin 7. gününde ilgili koriyoallantoik membran yüzeyine yerleştirilmiş ve 12. güne kadar gelişim takip edilmiştir. Embriyonik gelişimin 12. gününde malzeme ve ilgili koriyoallantoik membran dokusu makro ölçekte fotoğraflanarak, Fiji yazılımı (Image J) ile kan damarı yoğunluğu açısından değerlendirilmiştir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Fiji yazılımı (ImageJ) kullanılarak bir embriyolu tavuk yumurtası koriyoallantoik membranında iskelelerin anjiyogenez üzerindeki etkisini analiz etmek için kullanılan yöntem

(A) Malzeme içeren tüm KAM'nin ölçeklenmiş ve kırılmış görüntüsü (beyaz okla gösterilmiştir). (B) Görüntüye 'Mexican Hat Filtresi' uygulama (C) 8-bit'e dönüştürülmüş görüntü. (D) Görüntünün tüm kan damarlarını içerecek şekilde eşiklenmesi. (E) Eşik uygulandıktan sonraki görüntü. (F) Yüzde kan damarı alanının ölçüldüğü iskele çevresindeki bölge.

Çeşitli bakır ve biyoaktif cam oranlarında katkılanmış gruplar, sadece kolajen ve sadece VEGF kullanılan gruplar ile karşılaştırmalı olarak kan damarı yoğunluğu bakımından incelenmiştir. Araştırma bulgularına göre kolajen iskele yapılarına artan konsantrasyonlarda Biyoaktif cam eklenmesinin kan damarı yoğunluğunu artırdığı tespit edilmiştir. Bununla beraber bakır katkılanan Kolajen-Biyoaktif cam kompozitlerinin VEGF uygulamalarına kıyasla anjiyogenezi önemli ölçüde artırdığı belirtilmiştir. Ancak bakır iyonlarının artan konsantrasyonlarında anjiyogenik etkinin belirgin düzeyde azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 2.14).

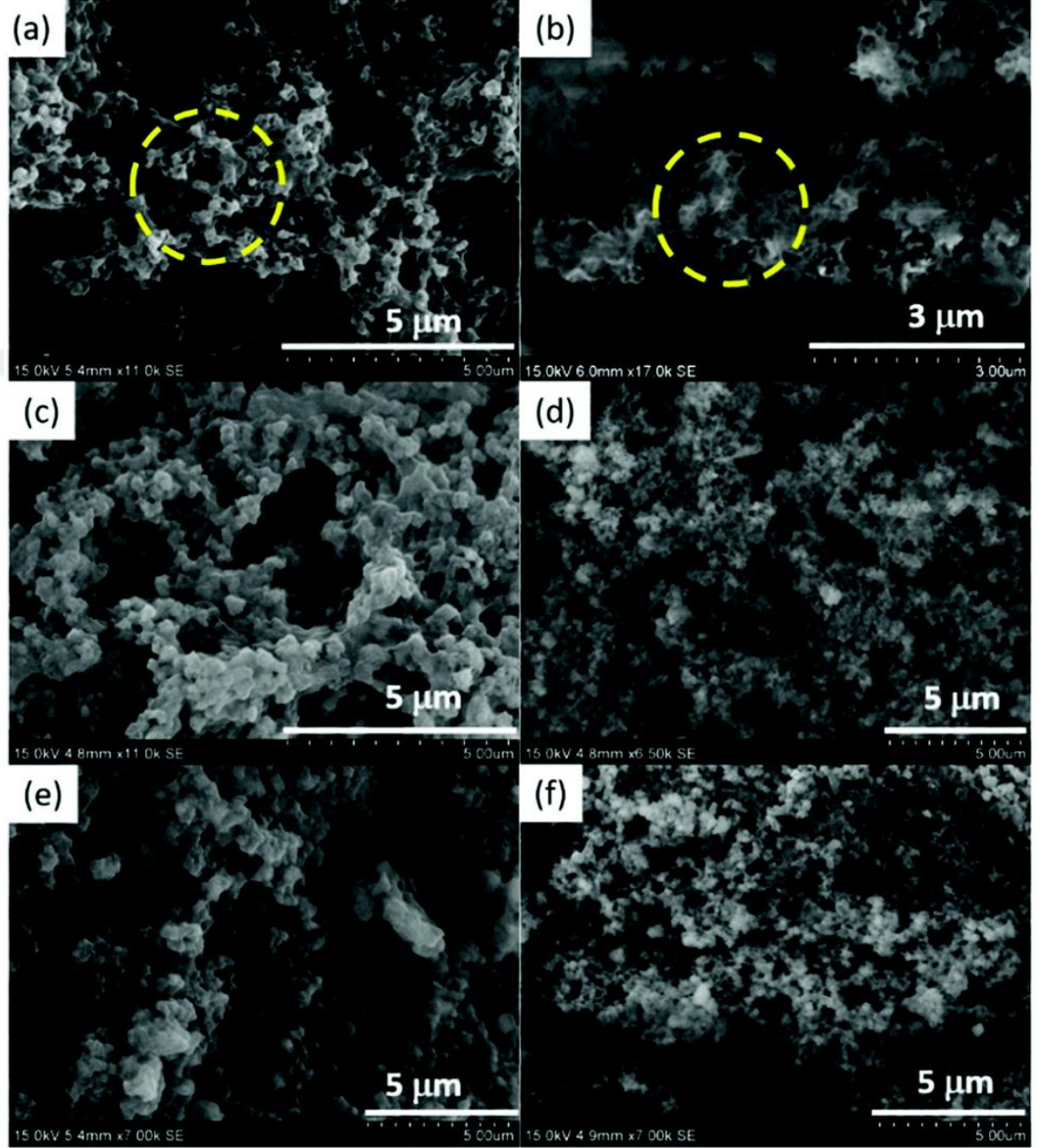


Şekil 2.14 Embriyolu tavuk yumurtası *ex ovo* modelinde biyoaktif cam iskelelerin anjiyogenez üzerindeki etkisi

(A) Çevreleyen KAM dokusunun biyoaktif cam iskelelere verilen anjiyojenik tepkinin temsili görüntüleri. (B) İskelelerin etrafındaki dairesel alanda kantitatif yüzde olarak belirlenmiş vaskülerize alan.

Durgalakshemi vd. (2020) farklı katalitik koşullar altında sol-jel yöntemiyle sentezledikleri Biyoaktif cam partiküllerinin biyoaktivite ve kan uyumluluğu çalışmalarını yapmışlardır. Biyoaktif cam partiküllerinin sentezlenmesinde katalizör olarak hidroklorik asit (HCl) ve nitrik asitin (HNO_3) kullanıldığı çalışmada malzemelerin biyoaktiflikleri SBF daldırma metodu ve hemolitik aktiviteleri ASTM F756 standardı uyarınca gerçekleştirilmiştir. Biyoaktifliğin incelendiği SBF daldırma

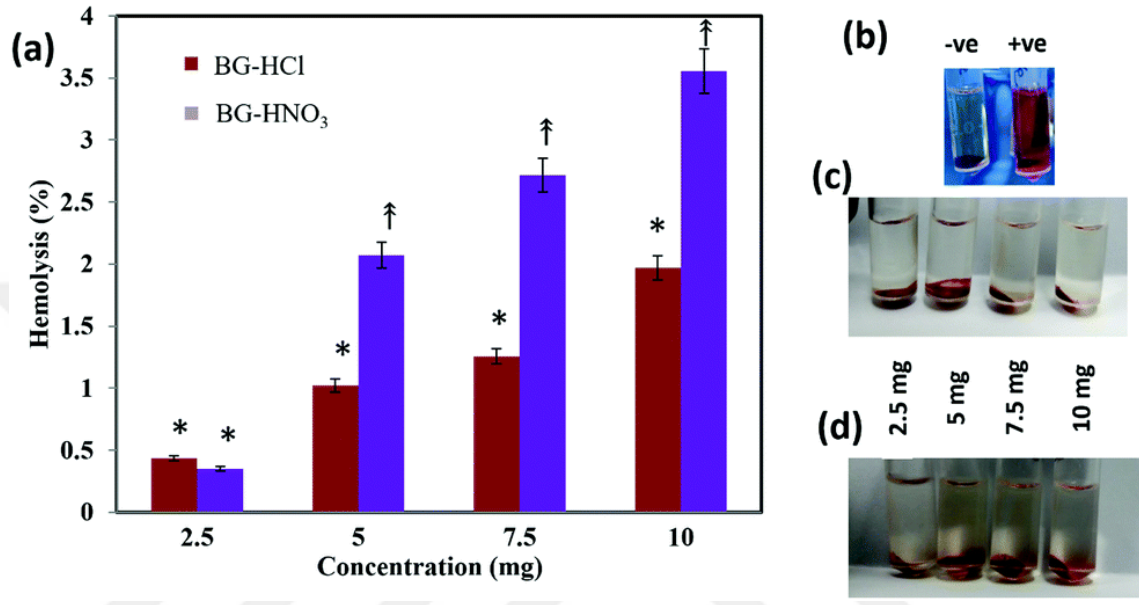
metodu sonrası katalizör olarak HCl'in kullanıldığı biyoaktif cam malzeme yüzeyinde apatit oluşum yüzdesinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Farklı katalizör koşullarında sentezlenen biyoaktif camların SBF daldırma işlemi sonrası görüntüleri

(a, c, e) BAC-HCl 1, 7 ve 14 günlük daldırma. (b, d, f) BAC-HNO₃ 1, 7 ve 14 günlük daldırma.

Malzemelerin kan uyumluluğu analizleri çeşitli konsantrasyonlarda biyoaktif cam partikülleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve belirtilen bulgulara göre hemoliz yüzdeleri her ikisi için 10 mg'lık en yüksek konsantrasyonun uygulamalarında ASTM F756 standardı sınır değeri olan %5'in altında bulunmuştur (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 (a) Çeşitli biyoaktif cam konsantrasyonları için hemoliz yüzdesi. (b) Pozitif (+) ve negatif (-) kontrolün resimli temsili; Çeşitli konsantrasyonlarda kan uyumluluğu analizine ait temsili görseller (c) BG-HCl ve (d) BG-HNO₃

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu tez çalışması kapsamında Deselülerize ve Demineralize Kemik Temelli Hidrojel üretimi için sığır femur kemikleri, Ankara Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü bünyesindeki hayvan kesim tesisinden, veteriner kontrolü altında kesimi yapılan sağlıklı sığırlardan elde edilip, kesimi takip edilen süreçte laboratuvara ulaştırıldı.

Femurdan kırılarak çıkarılan süngerimsi kemik dokusundan hidrojel eldesi için işlemler boyunca kullanılan, sodyum klorür (NaCl), hidroklorik asit (HCl), kloroform (CHCl₃), Metanol (CH₃OH), Tripsin, EDTA, Penisilin/Streptomisin, Pepsin, sodyum hidroksit (NaOH), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D.) firmasından temin edildi.

45S5 Biyoaktif Cam sentezi sırasında kullanılan nitrik asit (HNO₃), tetraetil ortosilikat [TEOS, Si(OC₂H₅)₄], trietil fosfat [TEP, OP(OC₂H₅)₃], kalsiyum nitrat tetrahidrat [Ca(NO₃)₂·4H₂O], sodyum nitrat (NaNO₃) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D.) firmasından temin edildi. Sentezlenen Biyoaktif Cam malzemenin yaşlandırma işlemi Etüv (Nüve, FN 500), sinterleme işlemi kül fırını (Protherm PLF 120/10, Türkiye) ile yapıldı.

Kompozit malzeme hazırlama işlemi manyetik karıştırıcı (IKA, C-MAC HS7) üzerinde +4°C’de gerçekleştirildi.

Hazırlanan malzemelerin sterilizasyonu, UV ışık kaynağı (254 nm) kullanılarak yapılmıştır.

İn vitro sitotoksosite çalışmaları için sterilize edilmiş örnekler 24 kuyucuklu kültür kabına (Corning, NY, A.B.D.) alındı, hücre besiyeri için DMEM F-12 (Lonza, Verviers, Belçika), pozitif kontrollerde hücre canlılığını etkileyeceği bilinen fenol (Sigma

Aldrich, St. Louis, MO, A.B.D.) kullanıldı. Çalışmada hücre kaynağı olarak insan dermal fibroblast hücreleri (ATCC, PCS-201- 012, Manassas, VA, A.B.D.) kullanılmıştır. Özütleme ve inkübasyon süreçleri 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübatörde (Heracell 240®, Waltham, MA, A.B.D.) gerçekleştirildi. *In vitro* sitotoksosite tayini için hücre canlılığı, mitokondriyel dehidrogenaz aktiviteleri belirlenerek MTT kiti ile gerçekleştirilmiş ve ölçümler UV multi plaka okuyucu (Molecular Devices, SpectraMax M2, CA, A.B.D.) kullanılarak yapılmıştır.

Kan uyumluluğu (Hemoliz) testi için malzemeler, kan ile 15 ml'lik santrifüj tüpleri (Corning, NY, A.B.D.) içerisinde inkübe edilmiş ve absorbans ölçümleri UV multi plaka okuyucu (Molecular Devices, SpectraMax M2, CA, A.B.D.) kullanılarak yapılmıştır.

Kompozit malzemelerin anjiyogenik özelliklerinin belirlenmesi kapsamında *ex ovo* Tavuk Embriyonik Koriyoallantoik Membran (KAM) ve Tavuk Aortik Halka (TAH) çalışmasında fertilize tavuk yumurtaları kullanılmış olup, işlemler Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 2021-22-203 numaralı kararına göre 2(2)"b" maddesi kapsamında değerlendirilerek Etik Kurul iznine tâbi olmadığı bildirilmiştir.

Türkiye Tarım ve Orman Bakanlığı Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen fertilize yumurtalar, Tavuk Aortik Halka (TAH) çalışmasında temizlenerek, 37 °C'de %75 nemli inkübatörde (Heracell 150i, Thermo Scientific, Waltham, MA, A.B.D.) 14 gün boyunca inkübe edildi. Embriyolar dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Steril pens ve cerrahi makas ile çıkarılan aortik uzantılar penisilin/ streptomisin içeren PBS ortamına alındı. İkili ve 3'lü aortik uzantılardan dallanan yapılar bistüri yardımıyla 1 mm'lik halkalar halinde kesildi. TAH çalışması için sterilize edilmiş olan kompozit malzemeler ve gömülen aortik yapılar 24 kuyucuklu kültür kabında (Corning, NY, A.B.D.), DMEM besiyeri içerisinde (2 mL, %2,5 FCS, 50 ünite/mL penisilin ve 50 µg/mL streptomisin katkılı, Biological Industries) 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübatöre alındı. Beş gün boyunca kültürü takip edilen örnekler Leica faz-kontrast mikroskopunda incelendi ve görüntülendi.

Embriyonik tavuk KAM çalışması için Türkiye Tarım ve Orman Bakanlığı Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen fertilize yumurtalar, inkübasyona alınmadan önce kabukları distile su ve %70 etil alkol ile temizlendi. İnkübasyon işlemi 37 °C'de %75 nemli ihtiva eden inkübatörde gerçekleştirildi. Embriyonik gelişimin 3. gününü takiben *ex ovo* kültür şartlarına geçilmiş ve kullanılacak olan petriler etil alkol ile steril edildi. Embriyonik gelişimin 7. gününde, implante edilecek olan malzemeler UV lambalı (254 nm dalgaboyu) laminar akışlı kabinde (Nuaire, Class II, Plymouth, MN, ABD) 3 saat boyunca steril edildi. Kontrol grubu olarak ticari kolajen (Collacone®, Ankara, Türkiye) kullanıldı. İmplantasyon işlemi laminar akışlı kabin (Nuaire, Class II, Plymouth, MN, ABD) içerisinde sürdürüldü. Embriyonik gelişimin 12. gününde ilgili malzeme ve çevresindeki membran dokusu steromikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) ile incelendi ve fotoğraflandı. Fotoğraflama işlemi takiben embriyolar kafayı gövdeden ayırmak suretiyle sakrifiye edildi. İmplant edilen ilgili malzeme ve çevresindeki 1 cm'lik ilgili koryoallantoik membran dokusu pens ve cerrahi makas yardımıyla, çıkarılarak %2,5'luk gluteraldehit Sigma-Aldrich (St. Louis, MN, ABD) solüsyonunda tespit edildi.

Tavuk Koryoallantoik Membran (KAM) çalışmasında kesilerek çıkarılan malzeme ve çevresindeki koryoallantoik membran dokusunun histokimya analizleri için gluteraldehitten alınan numuneler temizlenerek, dondurma çözeltisinde (Tissue Freezing medium; Tissue-Tek, Sakura, Zuid-Holland, Hollanda) donduruldu ve 8-10 µm kalınlığında kriyokesitler, kriostat cihazı (Leica Microsystems CM 1900, Nussloch, Germany) ile alındı. Kesit alma işleminden sonra numuneler, hematoksin ve eosin [H&E, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D)] ile boyanıp Leica ışık mikroskopunda (Wetzler, Almanya) incelendi ve görüntüleri alındı.

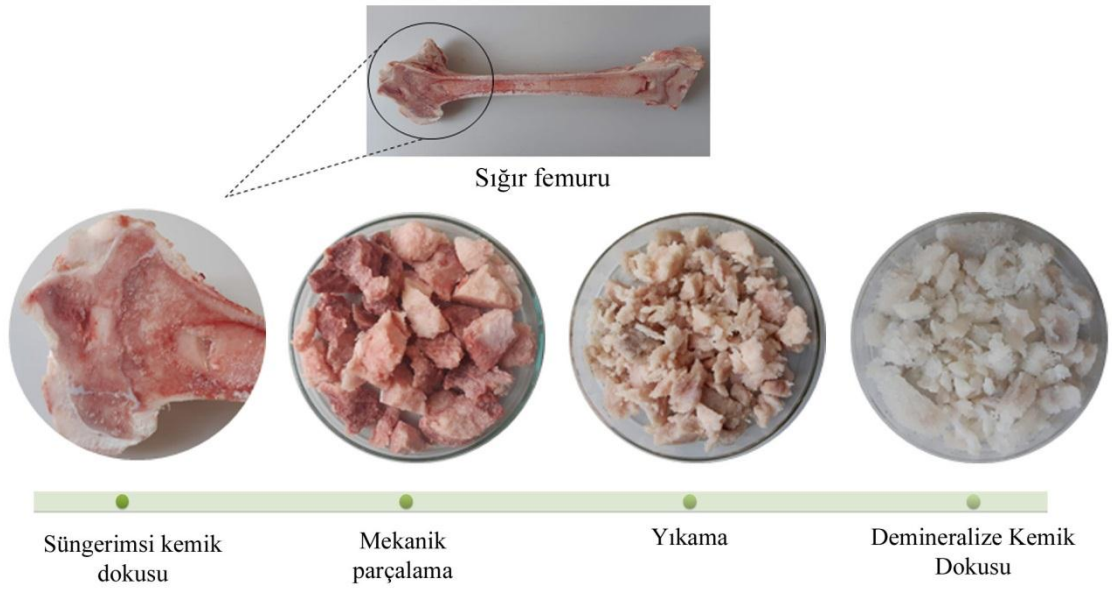
Tavuk KAM çalışmasının ardından osteogenez çalışmasının yapılması amacıyla embriyoların arka uzuvları kesilerek çıkarıldı ve %10 formalin (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D.) içerisine alındı. Kemik dokularının osifiye alan analizi için boyamalarda Alsiyen mavisi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ve Alizarin kırmızısı (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanıldı. Görüntüler Leica ışık mikroskopunda (Wetzler, Almanya) alındı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Demineralize ve deselülerize kemik matriks (DKM) üretimi

Menşei Türkiye olan sığırlardan elde edilen femur kemik dokuları, %0,9' luk sodyum klorür (NaCl) çözeltisi ile yıkanıp ardından, uygun mekanik yöntemler ile 2-3 cm' lik küçük parçalara ayrıldı. Elde edilen kemik dokuları daha sonra demineralizasyon ve deselülerizasyon işlemlerine tâbi tutuldu.

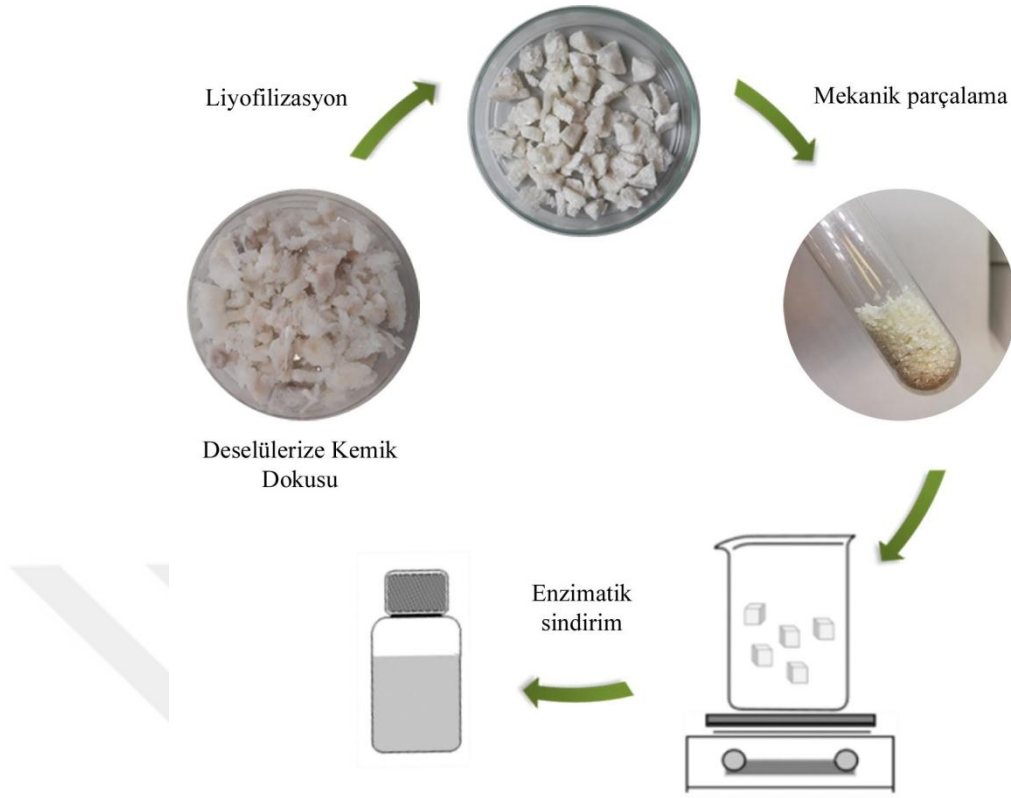
Demineralizasyon işlemi için sığır kemik dokuları, her bir gramda 25 ml solüsyon olacak şekilde 0,5 N hidroklorik asit (HCl) çözeltisinde bekletildi. İşlem oda sıcaklığında sürekli karıştırılarak 1 gün süre ile uygulandı. Bu sürenin sonunda sığır kemik dokuları içinde bulundukları asitten uzaklaştırılmak için bir süzgeç yardımıyla süzüldü ve seri distile su yıkamaları yapıldı. Sığır kemik dokusunda bulunan yağ doku kalıntılarının uzaklaştırılması için doku örnekleri, kloroform:metanol (1:1) karışımı içinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak bekletildi. Daha sonra alınan dokular metanol ve ardından distile su yıkamaları yapılarak petri kaplarına alındı. 24 saat süreyle -80 °C'de bekletilip dondurulan dokular liyofilize edildi (**Şekil 3.1**).



Şekil 3.1 Demineralize kemik dokusu üretim aşamalarının genel seyri

Demineralizasyon işlemine tâbi tutulan sığır kemik dokuları distile su ile yıkandı. Yıkanan dokular orbital karıştırıcı üzerinde PBS içinde hazırlanmış % 0,05 tripsin-%0,02 EDTA çözeltisi ile 37 °C’de %5 CO₂’de 24 saat süre ile muamele edildi. Süre sonunda süzülerek alınan dokular %1 Penisilin/Streptomisin içeren PBS solüsyonuna alınarak, +4 °C’de 24 saat boyunca karıştırılarak muhafaza edildi. Ardından 24 saat süre ile -80 °C’de bekletilip dondurulan dokular tekrar liyofilize edildi.

Demineralizasyon ve deselülerizasyon işlemleri sonunda elde edilen sığır kemik temelli matriksler jelasyon işlemi için küçük parçalar halinde öğütülerek, 1 mg/ml Pepsin içeren 0,01 N hidroklorik asit çözeltisine, mililitrede 10 mg kemik matriksi olacak şekilde eklendi. Oda sıcaklığında sürekli karıştırılarak devam edilen bu işlem 4 gün boyunca oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Dördüncü günün sonunda jel oluşumu gözlemlenen örnek -20 °C’de nötralizasyon işlemi uygulanana kadar bekletildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 DKM dokusundan jel oluşturma şeması

3.2.2 DKM karakterizasyonu

3.2.2.1 DNA içeriğinin belirlenmesi

Deselüerize kemik matriksi (DKM) numunelerindeki DNA içeriğinin belirlenmesi için, 24 kuyucuklu kültür kaplara aktararak, önce 24 saat boyunca -80°C 'de donduruldu ve ardından liyofilize edildi. Liyofilizasyon işlemi sonrasında süngerimsi DKM, 1 cm^2 ($1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$) boyutlarında steril koşullarda kesilerek DNA içerikleri analiz edildi.

Alınan örnekler 10 mM Trizma (Tris-hidroklorik asit), 50 mM potasyum klorür (KCl), 1,5 mM magnezyum klorür (MgCl_2), %0,5 Tween20 ve 20 mg/mL Proteinaz K içeren çözelti içerisinde 55°C 'de 48 saat boyunca bekletildi. Ardından çözelti $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 3000 devir/dakika'da 15 dk santrifüj edilerek süpernatant ortamdan alındı. Toplanan süpernatant üzerine hacimsel olarak sırasıyla 25:24:1 oranında fenol:kloroform:izoamil

alkol eklenerek +4°C’de, 3000 devir/dakika 15 dk süre ile santrifüj edilerek süpernatant toplandı. Alınan süpernatant üzerine 200 µL 3 M sodyum asetat (pH: 5,5) ve 500 µL %95’lik etil alkol eklenerek -80°C’de 20 dk bekletildi. Ardından 37°C’de 30 dk bekletildi ve 25°C’de 10000 devir/dakika’da 10 dk süre ile santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Kalan pelletin üzerine 100 µL distile su eklenerek 260 nm ve 280 nm dalga boylarında UV ölçümleri alınarak ortalama DNA konsantrasyonu ve saflığı hesaplandı.

Herhangi bir işleme maruz bırakılmamış saf sıgır süngerimsi kemik dokusu kontrol olarak alındı ve DNA miktarındaki yüzde azalma aşağıdaki eşitlik dikkate alınarak belirlendi.

$$\text{DNA konsantrasyonu} = \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

3.2.2.2 Sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) içeriğinin belirlenmesi

DKM hidrojel yapısında bulunan GAG içeriğinin tespiti için, Blyscan kiti (Biocolor, Carrickfergus, Kuzey İrlanda) kullanıldı. Hidrojel içerisindeki GAG içeriği, katyonik bir boya olan 1,9-dimetilmetilen mavisinin (DMMB), proteoglikanların sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) zincirlerine ve protein içermeyen sGAG zincirlerine spesifik olarak bağlanması esasına dayanarak belirlenir.

Prosedür üretici firma talimatları dikkate alınarak yapıldı. Liyofilize edilen saf ve deselülerize kemik doku numunelerinden eş miktarda tartılan örnekler, içeriğinde 100 mM fosfat tamponu, 10 mM sistein ve 10 mM EDTA (pH 6.3) (Sigma-Aldrich) bulunan 1 mL papain süspansiyonu ile 60 °C’de gece boyunca bekletilerek enzimatik sindirme işlemi uygulandı. Ardından toplanan örnekler 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Her numuneden 50 µL alınarak toplam hacim 100 µL olacak şekilde uygun tampon çözeltisi ilave edildi. Glikozaminoglikan standartları için, 1 µg, 2 µg, 3 µg ve 4 µg içeren referans standart solüsyonları kullanılarak, örnekler 30 dakika boyunca 1:10 Blyscan boya reaktifi ile karıştırıldı. Ardından sGAG-boya kompleksini içeren çözelti santrifüjlendi ve pelletler yıkandı. Yıkanan pelletlerin 1 mL ayrıştırma tamponunda

yeniden süspansiyonu yapıldı. Çözünmeyi takiben örneklerden 200 µL alınarak SpectraMax M5 spektrofotometrede (Molecular Devices, CA, A.B.D.) 645 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. sGAG içerikleri, mL başına mikrogram sGAG olarak ifade edildi.

3.2.2.3 Kolajen içeriğinin belirlenmesi

DKM yapılarının kollajen içeriğinin tayini Sircol™ (Biocolor, Carrickfergus, Büyük Britanya) kiti kullanılarak yapıldı. Kolajen tayini amacıyla, ilk olarak liyofilize edilen doğal süngerimsi kemik dokusu ve deselülerizasyon işlemine tâbi tutulan süngerimsi kemik dokularından 10'ar mg numune tartılarak ekstraksiyon işlemi için mikrosantrifüj tüplerine alındı. Daha sonra 0,1 mg/mL pepsin, 0,5 M asetik asit içerisinde çözüldü ve bu çözeltiden 1 mL alınarak numunelerin üzerine eklendi. Ekstraksiyon işlemi, 4°C'ye ayarlanan Eppendorf marka ThermoMixer C model mekanik karıştırıcı (Hamburg, Almanya) kullanılarak 48 saat boyunca sürdürüldü. 48 saat sonunda numunelerden 100 µL alınarak, üzerlerine 1 mL Sircol boya reaktifi eklendi ve sonrasında 30 dakika boyunca hafif çalkalama modunda etkileştirildi. Çalkalama işlemini takiben numuneler 12000 devir/dakika'da 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak pelletlerin üzerine 750 µL Sircol asit-tuz yıkama reaktifi eklendi ve tekrar 12000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak pelletlerin üzerine Sircol alkali reaktifinden 250 µL eklendi ve boyanın çözünmesi sağlandı. Elde edilen süspansiyondan 200 µL alınarak 96 kuyucuklu kültür kabına aktarıldı ve ardından 555 nm dalga boyunda SpectraMax M5 spektrofotometre (Molecular Devices, CA, A.B.D.) cihazı kullanılarak absorbans değerleri ölçüldü. Standart eğrisi kullanılarak dokuların kolajen içerikleri belirlendi.

3.2.3 DKM hidrojel üretimi

Hidrojel eldesi için -20 °C'de muhafaza edilen viskoz DKM yapılarının buzlu bir kap içerisine alınarak yavaş yavaş çözünmesi sağlandı. Jel örneği daha sonra uygun miktarda 0,1 M sodyum hidroksit (NaOH) ilavesi ile pH:7,4 olacak şekilde ayarlandı.

İşlem, eklenen NaOH'in homojen dağılması için manyetik karıştırıcı üzerinde ve ekzotermik reaksiyona bağlı sıcaklık artışının engellenmesi için ayrıca buzlu bir kap içerisinde gerçekleştirildi. Ardından 10:1 oranında 10x PBS eklenerek karıştırılan jel nihai polimerize hidrojel eldesi için 37 °C'de inkübe edildi (**Şekil 3.3**).



Şekil 3.3 İnkübasyon sonrası DKM hidrojel görünümü

3.2.4 Sol-jel yöntemi ile 45S5 biyoaktif cam (BAC) sentezi

İki gram biyoaktif camın sentezlenmesi için öncelikle hidroliz reaksiyonunun katalizlenmesi amacıyla 0.2 N nitrik asit sulu çözeltisi hazırlandı ve içerisine sırası ile (0,015 mol) 3,34 ml TEOS, (0,0016 mol) 0,28 ml TEP, (0,087 mol) 2,062 g kalsiyum nitrat tetrahidrat, (0,016 mol) 1,34 g sodyum nitrat eklendi. İşlem, manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında ve her kimyasal eklenmeden önce 60 dk beklenerek uygulandı.

Nihai berrak sol-jel karışımı, hava almayan cam bir şişeye alınarak 60 °C'de 3 gün yaşlandırma işlemine tâbi tutuldu. Yaşlandırma işlemi sonrasında elde edilen jel, önce 120 °C'de 24 saat kurutuldu ve ardından 700 °C'lik kül fırınında 3 saat boyunca sinterlendi. Sinterlenen örnekler hava almayan bir kap içerisinde 24 saat soğumaya bırakıldı. Sinterlenen biyoaktif cam örnekleri daha sonra havanda tokmak ile dövülerek, istenilen 63 mikrometre boyutlarında gözenek büyüklüğüne sahip eleklerden elendi.

Elde edilen biyoaktif cam örnekleri XRD ve FTIR analizleri için hazırlandı.

3.2.5 BAC karakterizasyonu

3.2.5.1 X-ışınları kırınımı (XRD) analizi

Sentezlenen 45S5 biyoaktif cam malzemenin atomik ve moleküler yapısını incelemek için, her bir kristal fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışını karakteristik kırınımı esasına dayanan XRD yöntemi kullanıldı. Analizler, Rigaku marka Ultima-IV model x-ışını kırınımı cihazında (Austin, TX, A.B.D.) gerçekleştirildi. Toz numuneler 2° /dakika tarama hızında analiz edildi.

3.2.5.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Sol-jel yöntemi ile sentezlenen BAC'ların yapı, bileşim ve fonksiyonel grup tayininin yapılması için, fonksiyonel grup titreşimlerini veren ışığın kızılötesi yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen kimyasal analitik FTIR yöntemi kullanıldı. BAC yapılarının incelenmesi amacı ile Perkin Elmer 400 marka cihaz (Waltham, MA, A.B.D.) kullanılarak ATR-FTIR spektrum ölçümleri yapıldı.

3.2.6 DKM hidrojel ve BAC kompozitlerinin oluşturulması

Demineralize ve Deselülerize kemik temelli hidrojel içerisine ağırlıkça %10 ve %20 oranlarında biyoaktif cam mikropartikülleri ilave edilerek oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcıda homojen bir dağılım gözlemlenene kadar karıştırıldı. Daha sonra hazırlanan örneklerden 1'er ml alınarak 48 kuyucuklu kültür kaplarına eklendi ve 20 dk boyunca 37 °C'deki etüvde bekletildi.

Katı bir jel görünümü kazanan örnekler daha sonra *in vivo* ve *in vitro* deneyler için UV altında 30 dk sterilize edildi. Kompozitlerin karakterizasyonu için SEM, TGA, FTIR ve su tutma analizleri yapıldı.

3.2.7 DKM hidrojel ve BAC kompozitlerinin karakterizasyonu

3.2.7.1 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve enerji dağılımlı X-ışını spektrometrisi (EDS) analizi

Sentezlenen DKM hidrojel ve 45S5 biyoaktif cam malzemelerin yüzey morfolojisi, element ve kimyasal yapılarının belirlenmesi için, donanımında enerji dağılımlı x-ışını spektrometresi (EDS) dedektörü bulunan ZEISS marka EVO 40 (Jena, Almanya) alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu kullanıldı. Görüntülemelerin yapılması için liyofilize edilen malzemeler, numune tablasına (stub) yapıştırılan iletken karbon bantlar üzerinde sabitlendi.

3.2.7.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

İncelenen örneklerdeki makromoleküllerin yapı, bileşim ve fonksiyonel grup bilgilerinin belirlenmesinde, fonksiyonel grup titreşimlerini veren ışığın kızılötesi yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen kimyasal analitik yöntem olan FTIR kullanıldı. Elde edilen DKM hidrojel ve DKM/BAC kompozitlerinin yapılarının incelemesi amacıyla Perkin Elmer 400 marka cihazı (Waltham, MA, A.B.D.) ile ATR-FTIR spektrum ölçümleri yapıldı.

3.2.7.3 Termogravimetrik analiz (TGA)

Malzemelerin sıcaklığa ve zamana bağlı olarak özelliklerinin değişiminin incelenmesi amacıyla TGA yöntemi kullanıldı. Termogravimetrik analiz, Perkin Elmer marka STA 6000 model TGA cihazı (Waltham, MA, A.B.D.) ile azot ortamında, 30 °C - 700 °C sıcaklık aralığında, 10 °C/dk ısıtma hızında gerçekleştirildi.

3.2.7.4 Su tutma analizi

Hazırlanan DKM hidrojelini kullanılarak, %10 ve %20 BAC kompozitlerinin hazırlanması için uygun miktarda BAC tartılarak eklendi ve hidrojeller 24 saat boyunca +4°C’de manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. DKM hidrojel ve kompozitleri 1’er ml olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kaplarına aktararak 1 saat boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Süre sonunda katılaştıran jel malzemeler çıkarılarak, 10 ml fosfat tamponu (PBS) içeren 6 kuyucuklu kültür kaplarına alındı. Daha sonra belirlenen zaman noktalarında (0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 saat) tampon ortamından alınan malzemeler kurutma kağıdı ile fazla yüzey suyu uzaklaştırıldıktan sonra tartıldı ve tekrar PBS içine konuldu. Her grup için örnekler 6 tekrarlı olacak şekilde işlemler uygulandı. Yüzde su tutma oranı (%STO), hidrojinin ilk ağırlığı (Hi) ve belirlenen zaman noktalarında alınan ıslak kütle ağırlığı (Hs) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\%STO = \left(\frac{H_i - H_s}{H_i} \times 100 \right) \times \frac{100}{H_i}$$

3.2.8 DKM hidrojelini ve BAC kompozitlerinin *in vitro* testleri

3.2.8.1 *In vitro* biyoaktivite testi

Sol-jel metodu ile sentezlenen 45S5 biyoaktif cam malzeme ve kompozitlerinin *in vitro* biyoaktivitesini ve mineralizasyonunu incelemek için Kokubo’nun simüle vücut sıvısı (SBF) kullanıldı. İnsan kan plazmasına benzer bir iyonik bileşimde olan SBF, biyoaktif malzemelerin çözünme oranını test etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. SBF’nin biyoaktif cam ile reaksiyonu, vücut sıvısı ile benzerlik göstermekle beraber, biyoaktif cam malzeme yüzeyinde osteoprodüksiyon için gerekli olan HA formlarının oluşumu indüklenmektedir.

Bu test için, biyoaktif cam mikropartikülleri, 21 güne kadar çeşitli süreler için vücut sıcaklığında (36.5- 37°C) SBF'ye bekletildi. SBF solüsyonu her 3 günde bir değiştirildi. Süreler sonunda numuneler distile su ile durulandı ve daha sonra 4 saat boyunca 70°C'de etüvde kurutuldu.

Mikroyapılardaki morfolojik özelliklerin belirlenmesi için SEM analizi ve içeriğindeki elementlerin tayini için EDS analizi gerçekleştirildi.

3.2.8.2 Hücre kültürü

Malzemelerin *in vitro* biyouyumluluk testleri için, dermal fibroblast hücreleri, hacimce %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sığır serumu içeren DMEM içerisinde, 37°C'de, %5 CO₂, %95 nem içeren ortam şartlarında inkübe edildi. İki günde bir defa olacak şekilde taze vasat değişimi yapılarak kültüre devam edildi.

3.2.8.3 Sitotoksosite testi

Sitotoksosite testi, biyomalzemedan ekstrakte edilen özütün muhtemel olumsuz biyolojik etkisini araştırmak için yapıldı. Sitotoksosite veya Ekstraksiyon testi, ISO 10993-5 (Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi) standardına uygun olarak yapıldı. İncelenen deney grupları **Çizelge 3.1**'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1 *In vitro* sitotoksosite testi deney grupları

Deney grubu içeriği
DKM
DKM + %10 BAC
DKM + %20 BAC
%10 BAC
% 20 BAC

Sitotoksosite testi için aşağıda belirtilen aşamalar takip edilmiştir;

- 1) İnsan Dermal Fibroblast hücreleri 24 kuyucuklu kültür kaplarına, kuyu başına 5×10^4 hücre/cm² olacak şekilde ekildi ve %5 CO₂, 37 °C’de inkübatöre alındı.
- 2) Eş zamanlı hazırlanan biyomalzeme örnekleri UV altında steril hale getirildi ve ardından 24 kuyucuklu kültür kabına konularak %5 CO₂, 37 °C’de inkübatöre alındı.
- 3) Biyomalzeme ve besiyeri 24 saat bekletildikten sonra, biyomalzeme özütünü içeren besiyeri toplanarak, besiyeri uzaklaştırılan hücrelere ilave edildi ve 48 saat boyunca aynı kültür koşulları altında bekletildi. Hücreler, pozitif kontrol grubu için 1,6 mg/mL besiyeri ile hazırlanan fenol çözeltisi ile ve negatif kontrol için ise normal besiyeri ile muamele edildi.
- 4) 48 saat sonunda hücrelerin canlılıklarını tespit etmek için MTT testi yapıldı.
- 5) MTT testi için, önce hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve ardından hücreler serumsuz besiyeri ile yıkandı.
- 6) Kuyucuklara 50 µL MTT ve 450 µL serumsuz besiyeri konularak 4 saat boyunca inkübe edildi.
- 7) İnkübasyondan sonra besiyeri ortamı uzaklaştırıldı ve oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için, 500 µL izopropional içinde hazırlanan 0,1 N HCl çözeltisi eklendi.

Oluşan formazan miktarını ölçmek için mikro-plaka spektrofotometre cihazı (SpectraMax M5, Molecular Devices) kullanılarak 570 nm dalgaboyunda absorbans ölçümleri yapıldı.

Canlı hücre sayısı 570 nm dalgaboyunda ölçülen absorbans miktarları ile belirlenen formazan kristallerinin, artan konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bağlı hücre canlılığının hesaplanması için aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{test}}}{\text{OD}_{\text{negatif kontrol}}} \times 100$$

3.2.8.4 Hemoliz (Kan uyumluluğu) testi

Geliştirilen biyomalzemelerin hemolitik aktivitesinin belirlenmesinde ISO 10993-4 standardına uygun olarak Hemoliz (Kan uyumluluğu) testi yapıldı. Bu kapsamda Hemoliz testi, *in vitro* şartlarda kırmızı kan hücrelerinin, malzeme ile doğrudan veya malzeme özütü ile teması halinde hemolizine neden olup olmayacağını değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Tam kan numunesinde, malzemeye bağlı hemolitik aktivitenin değerlendirilmesinde, parçalanmış eritrosit ve salınan hemoglobini ifade eden hemoliz yüzdesi; spektrofotometrede alınan absorbans değerleri kullanılarak hesaplandı. Hemoliz yüzdesi aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Hemoliz yüzdesi (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{negatif kontrol}})}{(\text{OD}_{\text{pozitif kontrol}} - \text{OD}_{\text{negatif kontrol}})} \times 100$$

Test için tam kan numunesi 1:20 oranında PBS tamponu ile seyreltilti. Test örnekleri (DKM hidrojel, DKM+ %10 BAC, DKM+ %20 BAC, %10 BAC, %20 BAC) UV altında steril edildikten sonra üzerlerine 2 mL seyreltilmiş tam kan süspansiyonu eklendi. Numuneler aksiyel karıştırıcı üzerinde 1 saat boyunca 37 °C’de inkübe edildi ve ardından 1500 devir/dakika 10 dakika süre ile santrifüjlendi. Tam kan numunesi negatif kontrol grubu için 1:20 oranında PBS tamponu ile pozitif kontrol için yine aynı oranda distile su ile seyreltilti.

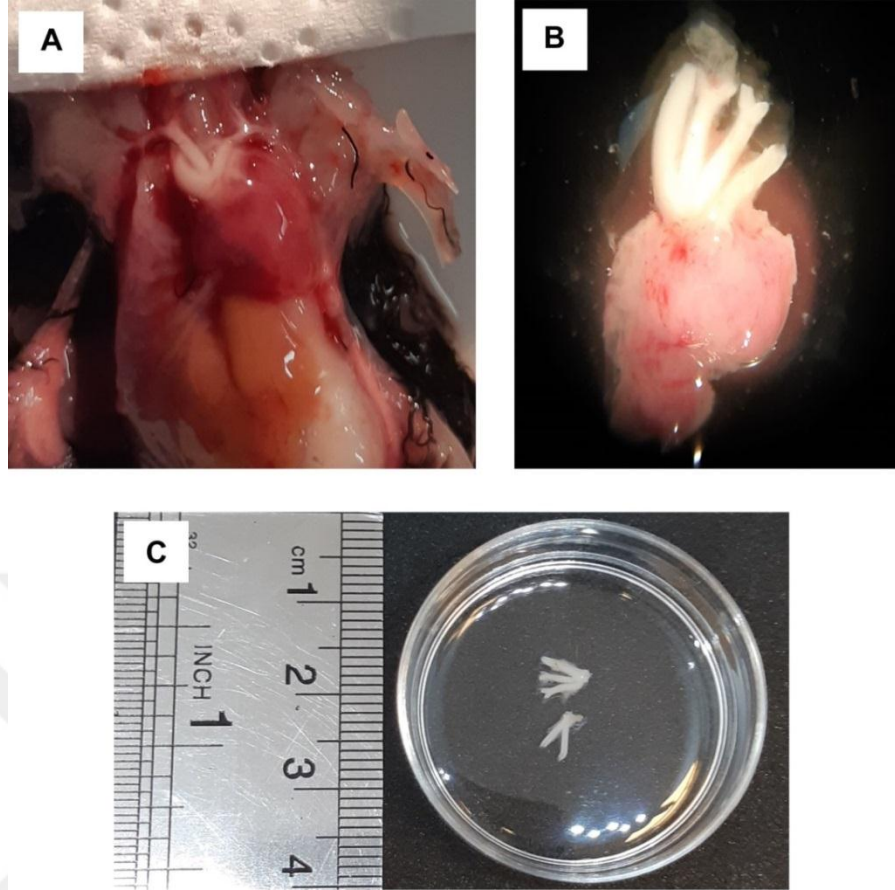
Daha sonra numunelerin süpernatantları 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına alınarak, mikro-plaka spektrofotometre cihazı (SpectraMax M5, Molecular Devices) ile 545 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Belirlenen absorbans değerleri dikkate alınarak hemolitik yüzdeleri hesaplandı.

3.2.9 *Ex vivo* embriyonik tavuk aortik halka (TAH) çalışması

Tavuk embriyonik aort eksplantları, hücre dışı matriks jellerine gömüldüğünde *ex vivo* olarak dallanma, mikrodamarların filizlenme gibi oluşumlar gösterme yeteneğine

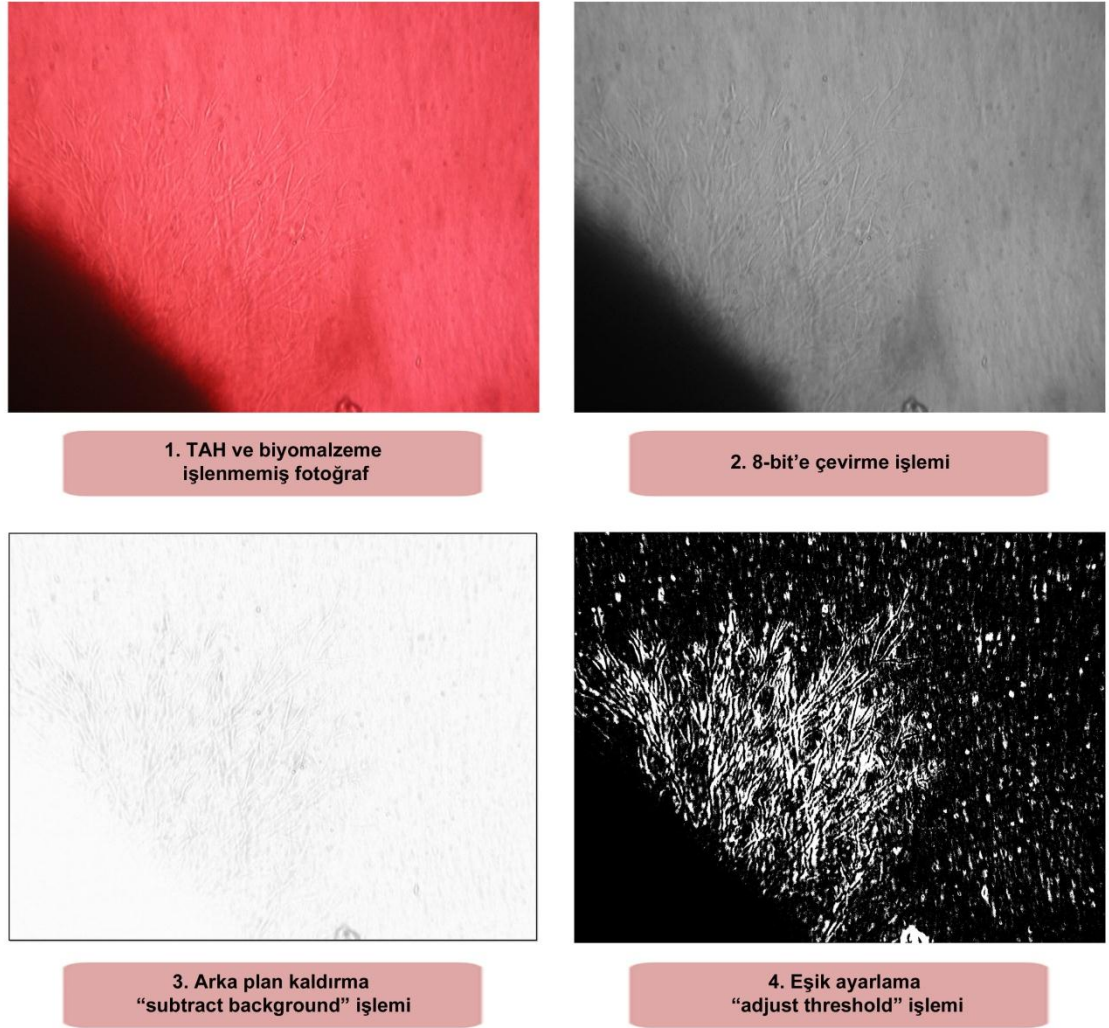
sahiptir. Bu teknik, anjiyogenez mekanizmalarını incelemek ve pro-anjiyojenik veya anti-anjiyojenik bileşiklerin etkinliğini test etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çalışma kapsamında embriyonik gelişimin (EG) 0. gününde temin edilen yumurtalar distile su ile temizlenerek 37 °C'de %75 nemli inkübatöre alındı. Aynı koşullar altında EG 14. gününe kadar *in ovo* gelişime imkan sağlandı. EG 14'te yumurtalar %70'lik alkol ile temizlendi ve kabuk steril bir petri kabının kenarına vurularak kırıldı. PBS içeren petri kabına alınan embriyo forseps ve makas yardımı ile çevresindeki dokudan uzaklaştırıldı. Hayvan deneyleri için önerilen protokoller ile tutarlı olarak hızlı bir şekilde ventral tarafı yukarı bakacak şekilde düzenlenen embriyo dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Aortik uzantı yapılarının çıkarılması için toraksik boşluğun üzerindeki doku kesildi. Kalp kaldırılıp yukarı doğru çekilerek aortik uzantıları embriyodan çıkarıldı. Kontaminasyonu önlemek amacıyla kalp ve aortik uzantıları penisilin/streptomisin içeren PBS içine alındı. Ardından diseksiyon mikroskobu altında 10x büyütmede aortik uzantıları çevreleyen dokular uzaklaştırılarak ikili ve üçlü aortik yapılar açığa çıkarıldı ve yeni PBS penisilin/streptomisin içeren bir petri kabına alındı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Embriyodan aortik yapıların eksplantasyonu. (A) Ventral pozisyonunda embriyo kalp ve aortik uzantıların genel görünümü. (B) Kalp ve aortik uzantılar. (C) İkili ve üçlü aortik uzantılar

Dokular ile çalışılmaya laminar akışlı kabin içerisinde devam edildi. Bu aşamada mikrocerrahi dürbünü kullanılarak dallanan yapılar bistüri yardımıyla 1 mm'lik halkalar şeklinde kesildi. Aortik halkalar daha sonra 50 μ L biyomalzeme (DKM, DKM+%10 BAC, DKM+%20 BAC) içeren 24'lü hücre kültürü kaplarına gömüldü ve 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sona erdiğinde kuyulara 2 mL DMEM eklenerek 37 °C'de, %5 CO₂ altında inkübe edildi. İnkübasyon 5 gün boyunca sürdürüldü ve günlük olarak mikroskopta görüntülendi ve fotoğraflandı. Aortik yapılardan dallanan endotelial uzantılar ve alansal yoğunlukları ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edildi (Şekil 3.5).



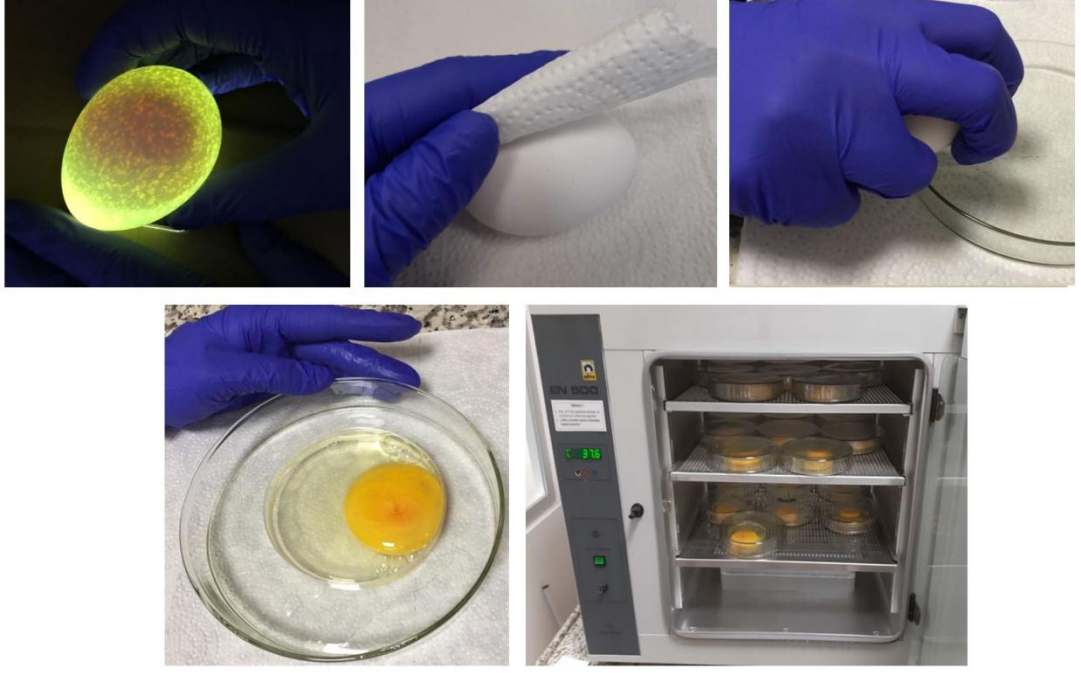
Şekil 3.5 TAH çalışmasında alınan görüntülere ImageJ yazılımı ile analiz için uygulanan işlemler

3.2.10 *Ex ovo* tavuk embriyonik koryoallantoik membran (KAM) çalışması

Embriyonik gelişimin (EG) 0. gününde temin edilen fertilize tavuk yumurtaları, distile su ile temizlendi ve 37 °C'de %75 nem şartlarına ayarlı inkübatöre alındı. Doğru embriyo pozisyonu ve en uygun KAM gelişimi için yumurtalar her 24 saatte bir çevrildi. EG 1'de germinal disk oluşumunu takiben ışıkla gözlemlendi ve EG 3'e kadar aynı koşullar altında bekletildi.

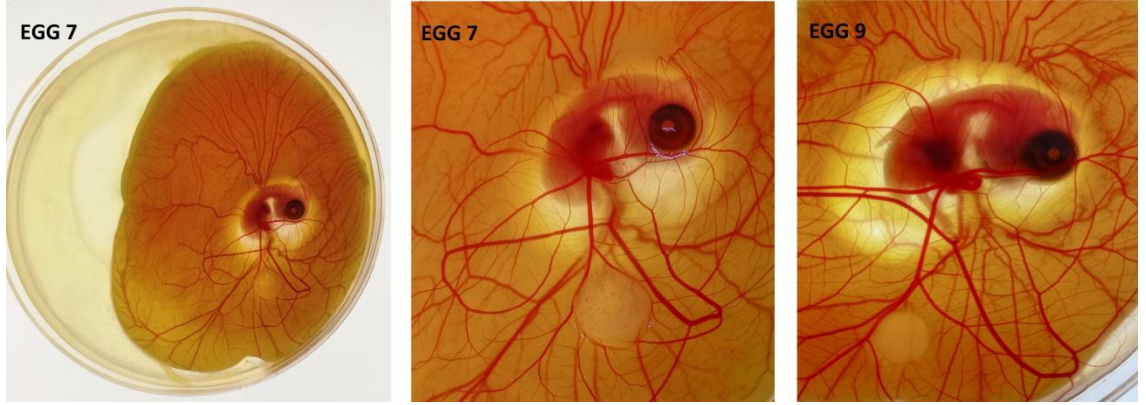
Işık ile embriyo gelişimi takibi yapılan yumurtaların, EG 3. gününde oldukları belirlendikten sonra %70'lik alkol ile steril edilen 90 mm'lik petri kabına, kabuğu

kırılarak alındı. Yumurta kabuğu kırılırken, embriyonun yukarı pozisyonunda olmasına dikkat edildi. Petri kabı daha sonra 150 mm'lik içinde 2 mL steril su ihtiva eden diğer bir petri kabına yerleştirildi (**Şekil 3.6**).



Şekil 3.6 Embriyolu tavuk yumurtası *ex ovo* modeli.

EG aşamaları takip edilen embriyoların, 7. günlerinde malzeme implantasyonuna uygun oldukları belirlendi. Biyomalzemenin yerleştirileceği uygun bölge, embriyo ile KAM'nin dış sınırları ve dallanan iki büyük damarın arasında olacak şekilde belirlendi. İlgili biyomalzeme steril koşullarda 7 mm çapında ve 2 mm eninde olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra belirlenen bölgeye steril pens ile yerleştirildi (**Şekil 3.7**).



Şekil 3.7 Embriyonun 7 ve 9. günlerinde genel görünümü ve ilgili biyomalzemenin implantasyonu

Aynı inkübasyon koşulları altında EG 12'ye kadar gelişimi takip edilen embriyolar (Şekil 3.8), anjiyogenik analizler için fotoğraflandı ve ardından embriyo başı gövdesinden ayrılarak sakrifiye edildi. Biyomalzemenin bulunduğu bölge ve çevresinde bulunan 1 cm'lik KAM dokusu makas ve pens yardımı ile kesilerek çıkarıldı. İlgili örnek %2,5'lik gluteraldehit solüsyonunda tesbit edildi ve histolojik analizler için +4 °C'de bekletildi.



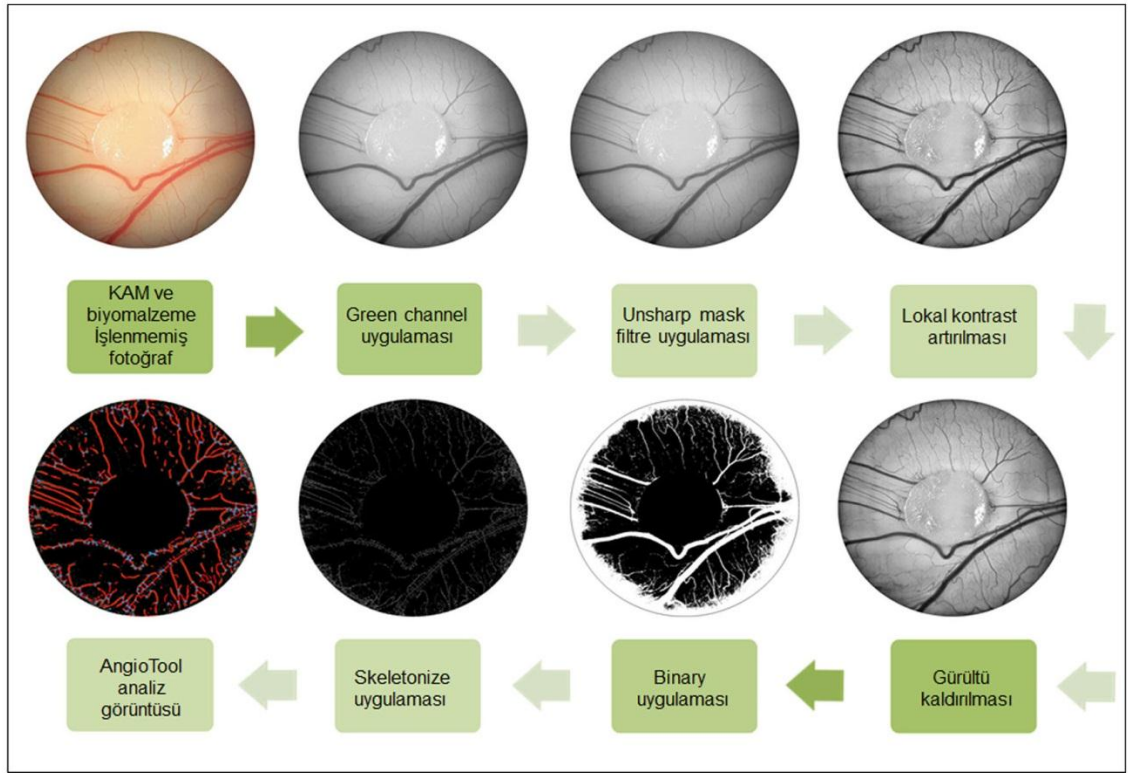
Şekil 3.8 Embriyonik gelişim günlerinin genel gösterimi.

3.2.10.1 Anjiyogenik özelliklerin belirlenmesine yönelik analizler

EG 12’de, eklenen biyomalzeme ve çevresindeki KAM dokusu, Leica marka stereomikroskopta incelendi. Malzeme ve malzemeye doğru gelişen kan damarları fotoğraflandı.

Fotoğrafi alınan ilgili bölgenin kan damarı yoğunluğunun belirlenmesi için görüntü analizleri, Adobe Photoshop, Fiji yazılımı (Image J) ve AngioTool yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

Mikroskopta ilgili KAM dokusu ve biyomalzemeyi içeren bölgenin fotoğrafları alındı. Fotoğraflar, öncesinde çapı ölçülen biyomalzemenin etrafında 4 mm KAM dokusu olacak şekilde dairesel olarak kesildi. Ardından, .jpeg uzantılı ham fotoğraf Adobe Photoshop’ta green channel uygulaması yapılarak kaydedildi. İşlemler bu aşamadan sonra Image J yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Image J yazılımında açılan fotoğrafa sırası ile unsharp mask filtresi, lokal kontrast artırılması, gürültü kaldırılması, binary ve skeletonize işlemleri uygulandı. Skeletonize işlemi sonrasında ilgili analiz AngioTool yazılımında uygun damar çapı ve yoğunluğu belirlenerek yapıldı (**Şekil 3.9**).



Şekil 3.9 İlgili KAM dokusu ve biyomalzemeye ait görüntülerin işleme basamakları ve genel görünüşleri

Bunun yanı sıra işlenen ve analizi yapılan görüntülerin karşılaştırılması için Onimagin Technologies SCA (Cordoba, İspanya) firmasından hizmet alınmıştır.

3.2.10.2 Histokimya analizleri

Kan damarı oluşumu ve enflamatuvar tepki analizleri için, 1-7 gün $+4^{\circ}\text{C}$ 'de %2,5'luk gluteraldehit solüsyonunda tesbit edilen ilgili malzeme ve KAM dokusu temizlenerek tespit çözeltisinin uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra uygun kalıplara yerleştirilen örnekler 30 dk kriyostat çözeltisinde bekletilerek -80°C 'de dondurulup kriyo kesit alma işlemi için hazırlandı. Kesit alma işlemi tamamlanan örnekler, hematoksiyen ve eozin (H&E) boyaması yapılarak Leica marka ışık mikroskopunda incelendi.

3.2.10.2.1 Hematoksilen ve eozin (H&E) boyaması

Hematoksilen ve eozin boyaması histolojik analizlerde, çekirdek ve sitoplazma ayrımı yapmak için rutin olarak kullanılan bir boyadır. Kriyostat ile alınan kesitlerin alkolde veya suda çözülmüş hematoksilen ve eozin ile boyanması temeline dayanır. Hematoksilen genellikle DNA'nın bulunduğu hücre çekirdeğini mavi-mor renkte boyayarak detaylı bir görüntü elde edilmesini sağlarken, Eozin; spesifik olmayan bir şekilde hücre sitoplazması ve bağ dokusu elemanları gibi protein yapılarını pembe, turuncu ve kırmızı renklerde boyar. Tipik bir dokuda çekirdekler mavi-siyah tonlarda boyanırken, hücre dışı madde pembenin farklı tonlarında boyanır.

Kesit alınan örnekler;

1. 2-3 dakika süre ile distile su ile nemlendirildi.
2. 8 dk süre ile hematoksilen boyası ile muamele edildi.
3. 10 dakika akan su altında yıkanarak, hematoksilen uzaklaştırıldı.
4. %95'lik etil alkol ile muamele edildi.
5. 30 saniye-1 dakika arası eozin ile boyandı.
6. Fazla boyanın uzaklaşması için %95'lik etil alkolden geçirildi.
7. Hazırlanan örnekler ışık mikroskobu ile incelendi.

3.2.11 Osteogenez çalışması

Geliştirilen DKM hidrojel, DKM+%10 BAC ve DKM+%20 BAC biyomalzemeleri ile ilişkili olarak osteojenik etkinliğin araştırılması için *ex ovo* embriyonik tavuk KAM çalışmasının ardından dekapitasyon yöntemi ile kurban edilen embriyoların arka uzuvları kesilerek çıkarıldı. Çıkarılan uzuvlar tesbit için 24 saat boyunca %10 formalin solüsyonunda bekletildi. Fiksasyonu takiben kıkırdak ve kemik oluşumunu ayırt etmek amacı ile Alsiyen mavisi ve Alizarin kırmızı ile boyanarak histolojik çalışmaları gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak ticari kolajen kullanıldı.

Fiksasyon süresi tamamlandıktan sonra uygulanan işlemler aşağıdaki gibidir;

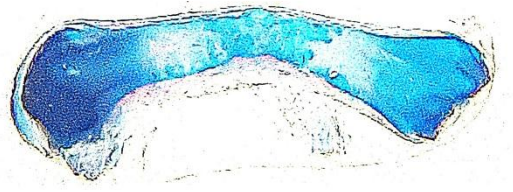
- 1- Arka uzuvları (femur, tibia ve fibula) çevreleyen fazla doku ve deri kalıntıları dikkatli bir şekilde çıkarıldı.
 - 2- Çıkarılan uzuvlar distile su ile 10 dk aralıklar ile 3 tekrarlı olacak şekilde yıkandı.
 - 3- Uzuvlar, 6:4 etil alkol/glasiyel asetik asit solüsyonuna 100 mL’de 9 mg Alsiyen mavisi eklenerek hazırlanan Alsiyen mavisi boyama solüsyonunda 24 saat bekletildi.
 - 4- Süre sonunda uzuvlar dehidrasyon için 24 saat boyunca etil alkolde bekletildi.
 - 5- Dehidrasyon işleminin ardından uzuvlar, %0,1 Alizarin kırmızısı içeren %0,5’lik potasyum hidroksit (KOH) solüsyonu ile 24 saat muamele edildi.
 - 6- Alizarin kırmızısı ile muamele edilen uzuvlar süre sonunda sırası ile %25 ve %50’lik gliserolde bekletildi ve ardından gliserolden alınan numuneler Leica S6D marka stereo mikroskop ile incelendi ve fotoğrafları alındı.
- İşlemler sonunda uzuvlara ait ilgili fotoğrafların osifiye alanları ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edildi.

3.2.11.1 Osifiye alan analizi

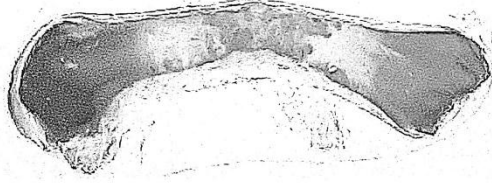
Osteogenez çalışması kapsamında Alsiyen mavisi ve Alizarin kırmızı ile boyanan embriyolara ait arka uzuvların fotoğrafları osifiye alanların belirlenmesi için ImageJ yazılımı kullanılmıştır (**Şekil 3.10**). ImageJ yazılımında fotoğraflara sırası ile meksika şapka filtresi (mexican hat filter), 8-bit’e çevirme ve eşik ayarlama (adjust threshold) işlemleri uygulandı. Uygulanan işlemler sonrası gliserolün ve kalan doku parçalarının yol açtığı arka plan kirliliği temizlendi. İşlemlerin ardından analiz (analyze) sekmesinde bulunan ölçüm (measure) aracı kullanılarak taranan alanların (Alsiyen mavisi ile boyanan kıkırdak dokusu) yüzde değerleri saptandı. Osifiye alanların belirlenmesi için incelenen uzuvdaki tüm alan taranarak ölçüm (measure) aracı ile ayrıca ölçümleri alındı. Elde edilen tüm alan ve Alsiyen mavisi ile boyanan alanlar oranlanarak uzuvlara ait osifiye alanların yüzdeleri belirlendi.



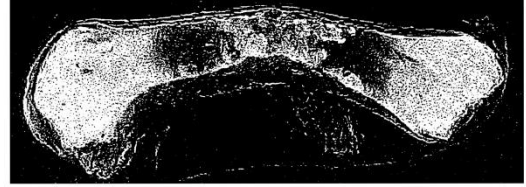
1. Boyama işlemi yapılan femur görüntüsü



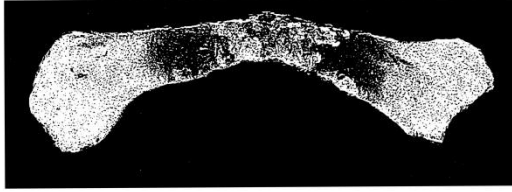
2. Meksika şapka filtresi "mexican hat filter" uygulaması



3. 8-bit'e çevirme işlemi



4. Eşik ayarlama "adjust threshold" işlemi



5. Arka plan kirliliği temizleme işlemi



6. Tüm alan tarama işlemi

Şekil 3.10 Boyama yapılan arka uzuvlara uygulanan işlemler.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 DKM Karakterizasyon Bulguları

4.1.1 DNA içeriğinin belirlenmesi

Bu tez çalışması kapsamında deselülerizasyon etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla deselülerize kemik matriks yapılarından DNA ekstraksiyonu ve miktarlarının spektrofotometrik ölçümleri alınmış ve ölçümler neticesinde elde edilen veriler **Çizelge 4.1**'de verilmiştir. Gerçekleştirilen DNA içeriği analizlerinde doğal sığır süngerimsi kemik dokusu ve çalışmada belirtilen demineralizasyon ve deselülerizasyon işlemleri uygulanan kemik matriks yapıları karşılaştırılmıştır. Hücresizleştirilmiş doku/organ yapılarının uygulama etkinliğini doğrudan etkileyen ve literatürde yaygın olarak kabul gören hücre dışı matriks kuru ağırlığında DNA miktarı < 50 ng/mg olarak belirtilmiştir. Tez çalışması kapsamında deselülerizasyonu yapılan kemik matrikslerine ait DNA miktarına bakıldığında bu değer 50 ng/mg değerinden düşük olduğu ($28,4 \pm 9,44$ ng/mg) ve deselülerizasyon protokolünün bertaraf edilen DNA miktarı bakımından uygun olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 Doğal ve hücresizleştirilen kemik dokusuna ait DNA miktarları.

Doğal kemik dokusu	Hücresizleştirilen kemik dokusu
$100 \pm 7,14$ ng/mg	$28,4 \pm 9,44$ ng/mg

4.1.2 sGAG miktarının belirlenmesi

Deselülerize kemik hücre dışı matriksine ait sGAG içeriği Blyscan™ (Biocolor, Carrickfergus, Büyük Britanya) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilerek kurutulmuş doğal kemik dokusu ve DKM yapıları tampon çözelti içerisinde Papain (P3125, Sigma, St. Louis, MO, ABD) kullanılarak ekstraksiyonunu takiben 1,9-dimetil-metilen mavisi boyası ile muamele edilmiş ve 656 nm dalgaboyunda SpectraMax® M5

(Molecular Devices LLC, CA, ABD) marka spektrofotometre ile ölçüm alınmıştır. Absorbans ölçümlerine dayanarak hesaplanan yüzde sGAG içeriği **Çizelge 4.2**'de verilmiştir. Ölçümler sonucunda kontrol olarak kullanılan doğal kemik dokusu ile kıyaslandığında hücresizleştirilen kemik matriks yapılarının sGAG içeriğinin $\%63,36 \pm 4,214$ oranında korunduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.2 Doğal kemik dokusu ve hücresizleştirilen kemik matriks yapılarının sGAG içeriği

Doğal kemik dokusu	Hücresizleştirilen kemik dokusu
$\%100 \pm 8,285$	$\%63,36 \pm 4,214$

4.1.3 Kolajen analizi

Deselülerize kemik matriksine ait kolajen içeriğinin belirlenmesi için kolajen içeriği analizi gerçekleştirilmiştir. Uygulanan deselülerizasyon protokolü ile elde edilen kemik matriks yapılarına ait veriler, kit üreticisinin standart kolajen çözeltisi referansı dikkate alınarak belirlenmiştir (**Çizelge 4.3**). Elde edilen bulgularda doğal süngerimsi kemik dokusundaki kolajen miktarı ile kıyaslandığında hücresizleştirilen kemik matriks yapısındaki kolajen miktarının $\%64,01 \pm 12,77$ oranında korunduğu belirlenmiştir.

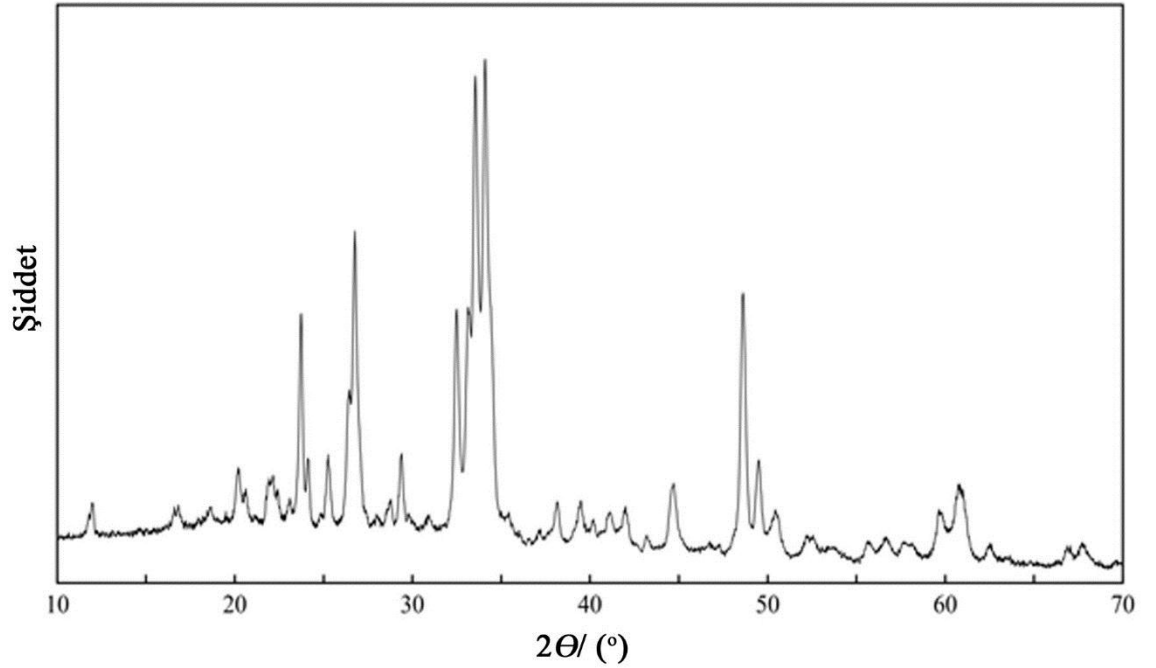
Çizelge 4.3 Doğal kemik dokusu ve hücresizleştirilen kemik matriks yapılarının kolajen içeriği

Doğal kemik dokusu	Hücresizleştirilen kemik dokusu
$\%100 \pm 11,06$	$\%64,01 \pm 12,77$

4.2 BAC Karakterizasyon Bulguları

4.2.1 XRD analizi bulguları

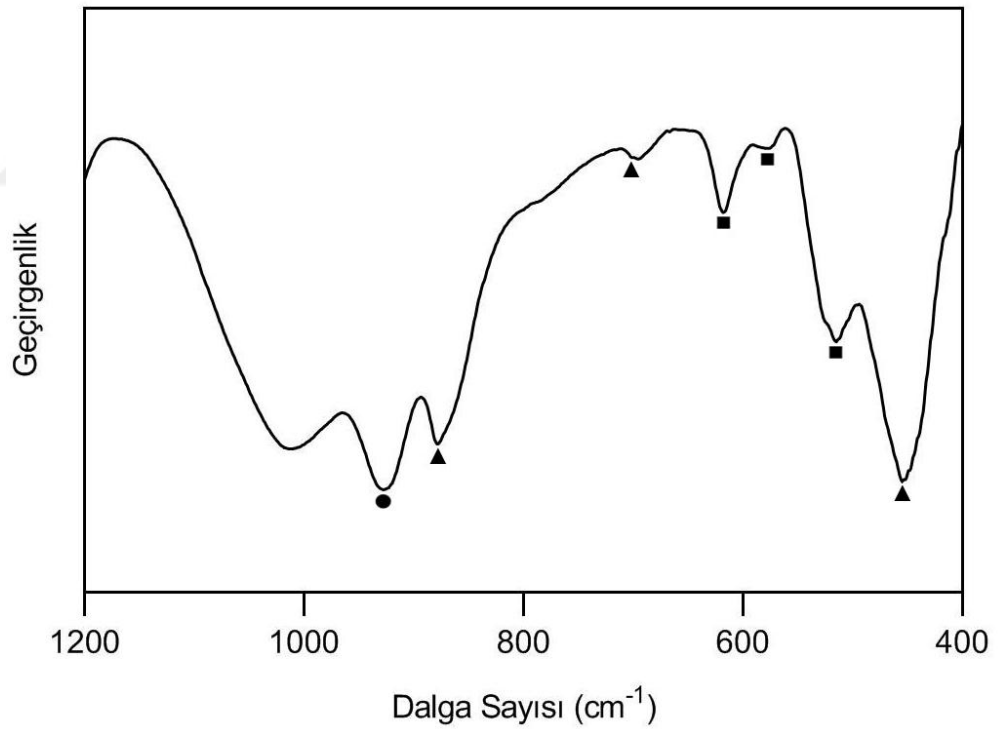
Sol-jel yöntemi ile sentezlenen 45S5 Biyoaktif cama ait XRD verilerinin grafiği **Şekil 4.1**'de verilmektedir. Elde edilen 45S5 Biyoaktif cam örneğinin XRD sonuçlarında, sinterlenmiş cam seramik yapısına özgü karakteristik tepe noktaları gözlemlenmekte ve literatür ile tutarlı belirgin kristal fazlarını desteklemektedir. Sol-jel türevi 45S5 cam seramiklere özgü silika bakımından zengin ana kristal faz kombeite ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$) atfedilen 2θ açıları (20.12, 23.72, 26.76, 33.54, 34.08 48.58, 60.7, 62.4, 66.76) ve fosfat bakımından zengin apatit benzeri kristal faz olan $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ 'a özgü 2θ açıları (32.48, 52.12, 56.54) belirgin olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.1 Sol-jel yöntemi ile sentezlenen 45S5 Biyoaktif cam partiküllerine ait XRD spektrumu

4.2.2 FTIR analizi bulguları

Sol-jel yöntemi ile sentezlenen 45S5 Biyoaktif cam malzemenin kimyasal yapı bileşenlerinin belirlenmesi amacı ile FTIR spektrum ölçümleri yapılmıştır (**Şekil 4.2**). Elde edilen FTIR spektrumu incelendiğinde, 450-460 cm^{-1} civarında gözlenen tepe noktası silikat camlara atfedilen Si-O-Si gerilme titreşiminden kaynaklandığı görülmektedir. 698 cm^{-1} ve 880 cm^{-1} dalga sayılarında gözlenen tepe noktaları kristal silikattaki $[\text{SiO}_4]^{4-}$ simetrik Si-O gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. Kristal yapıda P-O bükülme titreşimlerine bağlı fosfat kristallerini karakterize eden 515, 574, 620 cm^{-1} civarında gözlenen güçlü tepe noktaları gözlenmiştir. Bununla beraber 926 cm^{-1} 'de gözlenen tepe noktası bağlanmamış oksijen atomlarının (NBO) Si-O gerilmesine ait titreşimi göstermektedir.

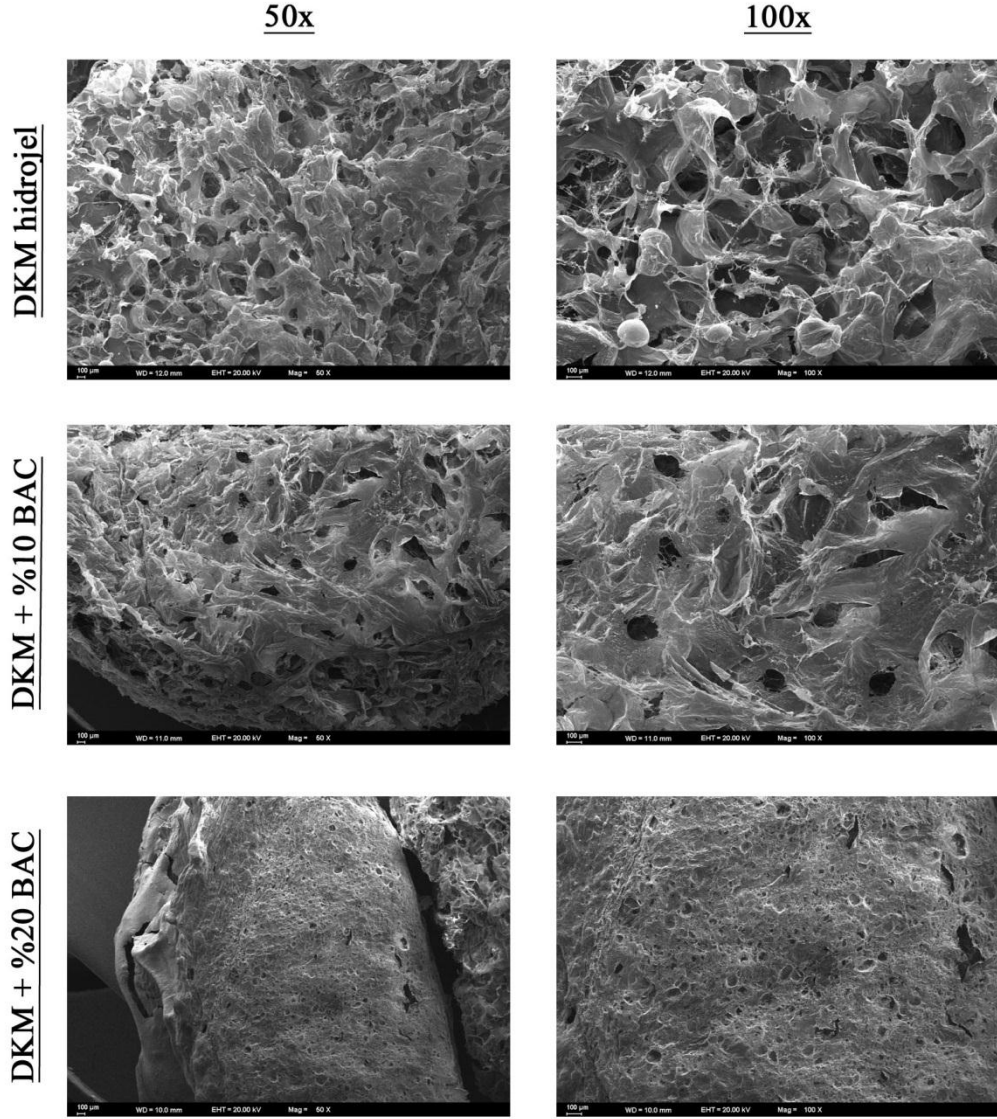


Şekil 4.2 45S5 Biyoaktif cama ait FTIR spektrumu.(▲: Si-O-Si, ■: P-O, ●: Si-O-NBO titreşim modlarını göstermektedir)

4.3 DKM Hidrojel ve BAC Kompozitlerinin Karakterizasyon Bulguları

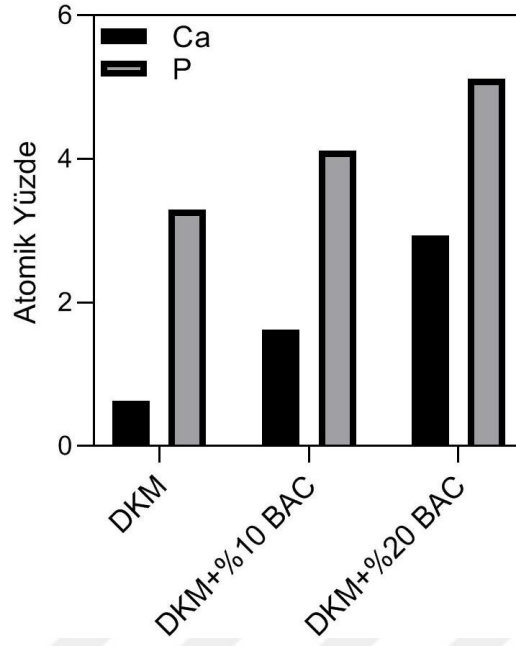
4.3.1 SEM ve EDS analizi bulguları

Deselülerizasyon ve demineralizasyon işlemleri sonrasında enzimatik jelleştirme işlemi uygulanan DKM hidrojel ve bu yapıya %10 ve %20 oranında BAC eklenerek hazırlanan kompozit biyomalzeme 37°C'deki fiziksel çapraz bağlanmasının ardından liyofilize edilerek üç boyutlu (3B) doku iskeleleri üretilmiştir. Doku iskelelerine ait SEM analiz bulguları **Şekil 4.3**'te yer almaktadır. Deselülerizasyon ve demineralizasyon işlemlerine tâbi tutulan kemik dokusu hücre dışı matriks içeriğinin bozunması hidrojel ve sünger iskele yapılarının oluşmasına imkan sağlamıştır. Oluşturulan DKM hidrojelinin ve BAC kompozitlerinin liyofilizasyonu ile elde edilen sünger iskeleler 37°C'de fiziksel çapraz bağlanmaya bağlı olarak özgün gözenekli bir mikro mimari sergilemiştir. Bunun yanı sıra DKM yapılarına eklenen BAC mikropartiküllerinin hidrojel içinde düzgün bir dağılımda olduğu ve yapılarda artan BAC konsantrasyonu ile beraber gözenek çaplarında azalma olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3 Liyofilize DKM ve kompozitlerine ait 50x ve 100x büyütme SEM görüntüleri

Biyomalzemelere SEM analizi ile eş zamanlı bölgesel EDS analizi yapılmıştır. EDS sonuçları incelendiğinde, liyofilize DKM yapılarına %10 ve %20 oranında eklenen BAC partikülleri ile beraber, kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) ait atomik yüzdelerin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.4).

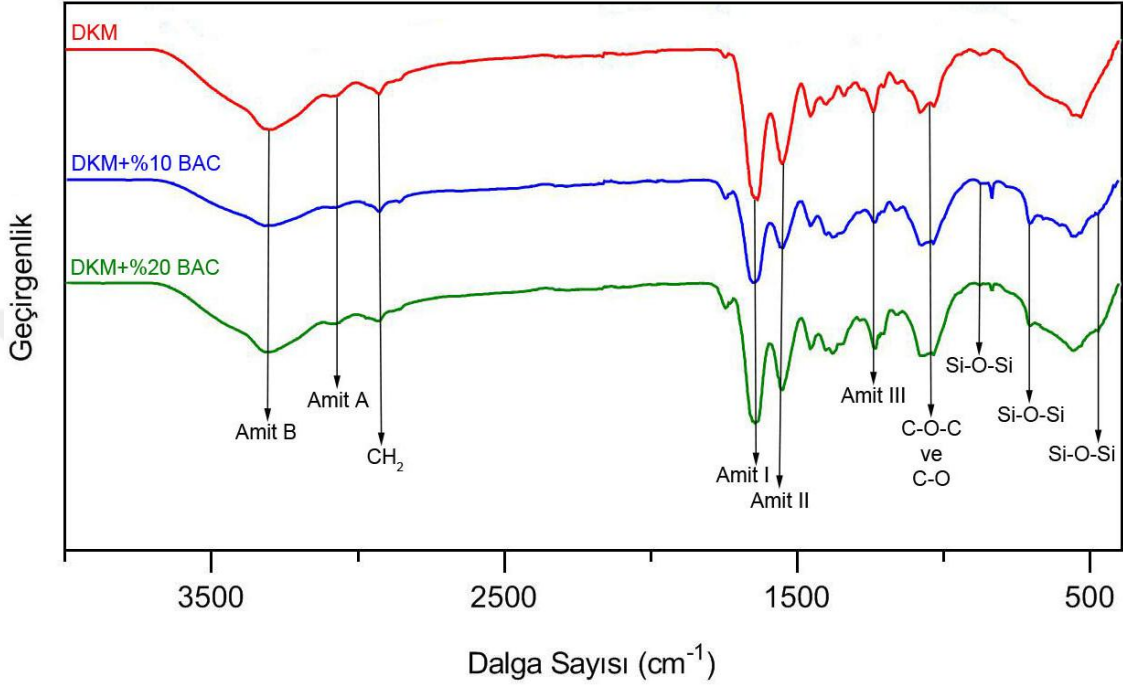


Şekil 4.4 EDS analizi sonuçlarında kalsiyum ve fosfor elementlerine ait atomik yüzdelerin gruplara göre değişimi

4.3.2 FTIR analizi

Deselülerize kemik matriks yapısı ve bu yapıya %10 ve %20 oranlarında Biyoaktif cam malzeme eklenerek elde edilen kompozit biyomalzemelerin kimyasal yapı bileşenlerinin belirlenmesi amacı ile FTIR analizleri yapılmıştır (**Şekil 4.5**). FTIR spektrumları incelendiğinde, DKM ve kompozit yapılarında bulunan kolajen fibriller ile ilişkili olarak amit bağlarına spesifik 1630 cm^{-1} Amit I, 1545 cm^{-1} Amit II ve 1230 cm^{-1} Amit III'e karşılık gelen tepe noktaları gözlenmiştir (Yang vd. 2018). Bunun yanı sıra yine DKM yapılarındaki kolajenden ileri gelen Amit A ve Amit B'ye karşılık; N-H gruplarına ait gerilme titreşimleri sırasıyla 3300 cm^{-1} ve 3085 cm^{-1} 'de belirgin tepe noktaları göstermiştir (Kong ve Yu 2007). $1040\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$ civarında DKM içeriğinde bulunan proteoglikanlar ile ilişkili karbonhidrat varlığı ve nükleik asit kalıntılarından kaynaklanan C-O-C ve C-O gerilme titreşimleri gözlenmiştir (Movasaghi vd. 2008). 2927 cm^{-1} 'de gözlenen C-H₂ asimetrik gerilim titreşiminden kaynaklanan tepe noktasının temelde lipitlere atfedilen ve bununla beraber az miktarda katkısı bulunan proteinler, karbohidratlar, nükleik asitler ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Kompozit yapılarda içeriğinde bulunan biyoaktif cam yapıları ile ilişkili olarak Si-O-Si gerilme

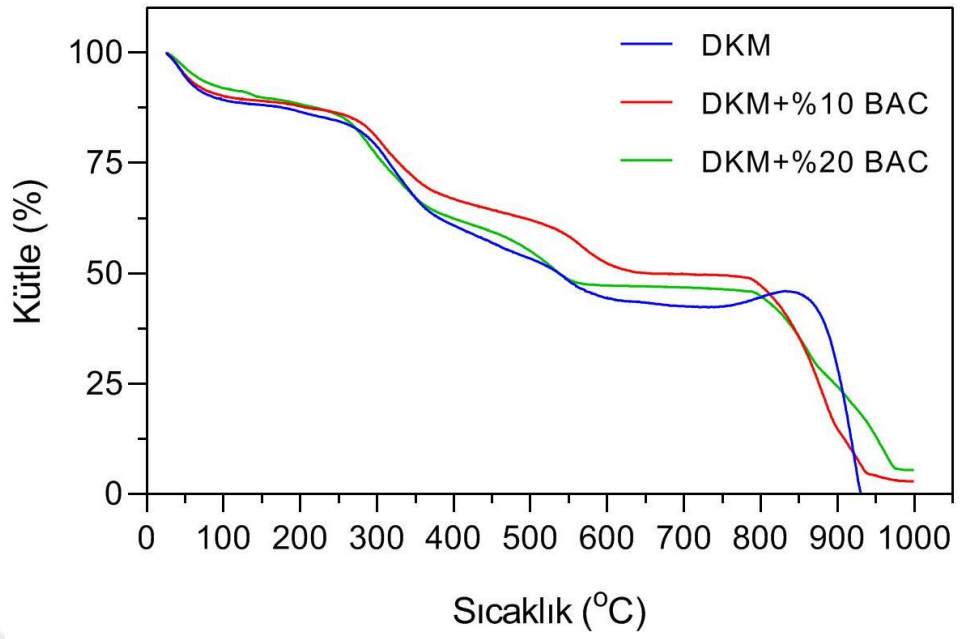
titreşimleri 450-460, 698, 880 cm^{-1} 'de gözlenmiş ve bu durum BAC mikropartiküllerinin DKM yapılarına dâhil edildiğini doğrulamıştır (Aguar vd. 2009, Vafa vd. 2021).



Şekil 4.5 DKM ve DKM/BAC kompozitlerine ait FTIR spektrumları.

4.3.3 TGA Bulguları

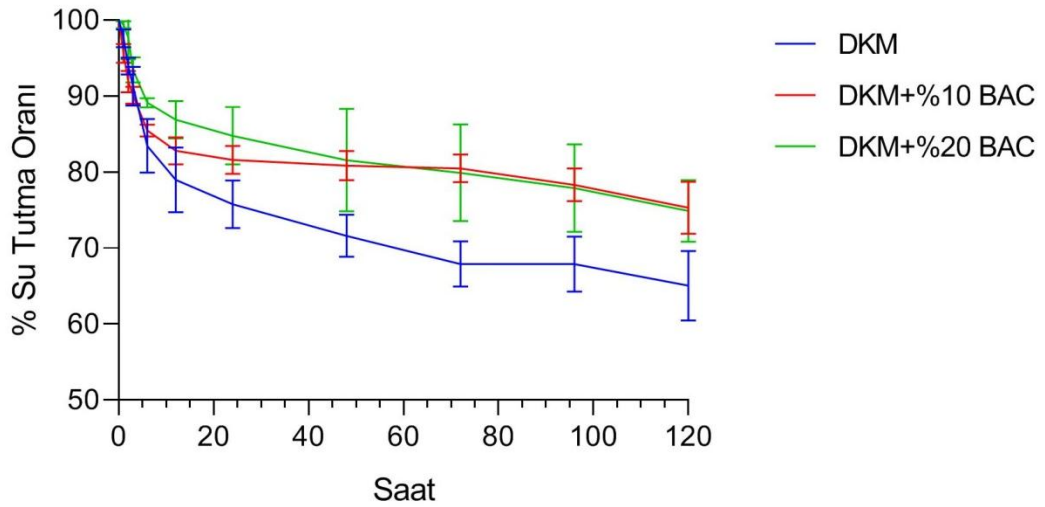
DKM, DKM +%10 BAC ve DKM +%20 BAC biyomalzemelerine ait termal bozunma davranışları, **Şekil 4.6**'da gösterildiği gibi termogravimetrik analizler ile incelenmiştir. Artan sıcaklıklar ile birlikte tüm gruplarda benzer bir kütle kaybı gözlemlenmiştir. Oda sıcaklığı ile 200 °C arasında gerçekleşen kütle kaybı kolajende bulunan suyun buharlaşması ile ilişkilendirilmiştir. 200 - 500 °C arasında gerçekleşen kayıp ise, kolajen moleküllerinin ayrışması ve 500 - 900 °C'de organik bileşenlerin yanması ile tipik hidrojel termogramlarına uygun üç fazlı kütle kaybı ile sonuçlanmıştır. Eklenen BAC kütlelerine doğru oranda, DKM +%10 BAC ve DKM + %20 BAC kompozitlerinin kalan kütleleri sırası ile (%2,88) ve (%5,41) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6 DKM, DKM +%10 BAC ve DKM +%20 BAC örneklerine ait termogravimetrik analiz sonuçları

4.3.4 Su tutma analizi

Su tutma analizinin yapıldığı tüm gruplarda yapılarındaki suyun zamana bağlı olarak azaldığı görülmüştür. DKM+%10 BAC ve DKM+%20 BAC kompozitlerinin sadece DKM hidrojel içeren gruba kıyasla, artan konsantrasyona bağlı olarak daha az su kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 4.7).

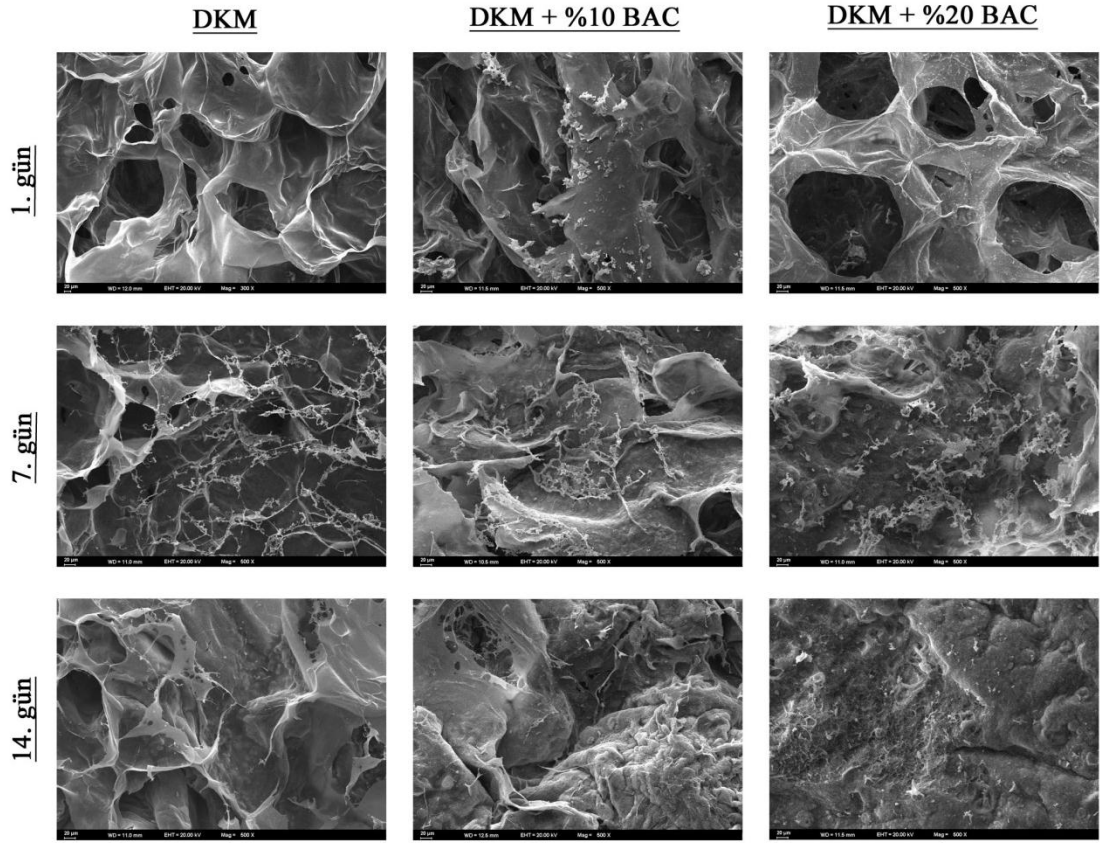


Şekil 4.7 DKM, DKM +%10 BAC ve DKM +%20 BAC yüzde su tutma grafiği.

4.4 DKM Hidrojel ve BAC Kompozitlerinin *In vitro* Test Bulguları

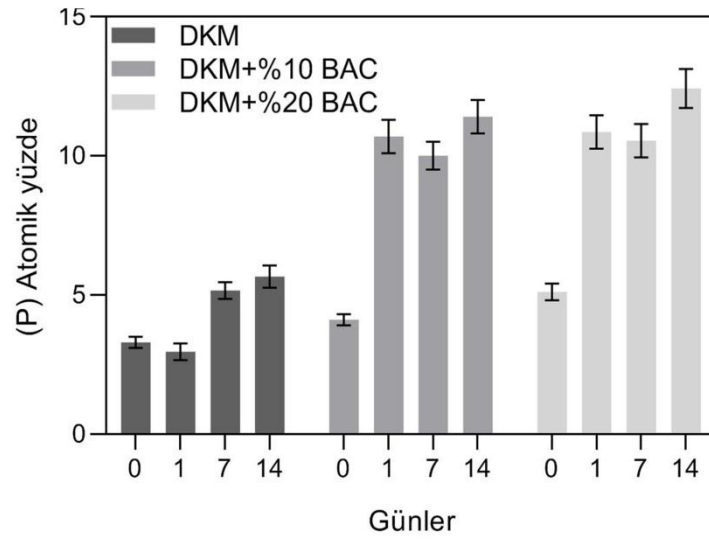
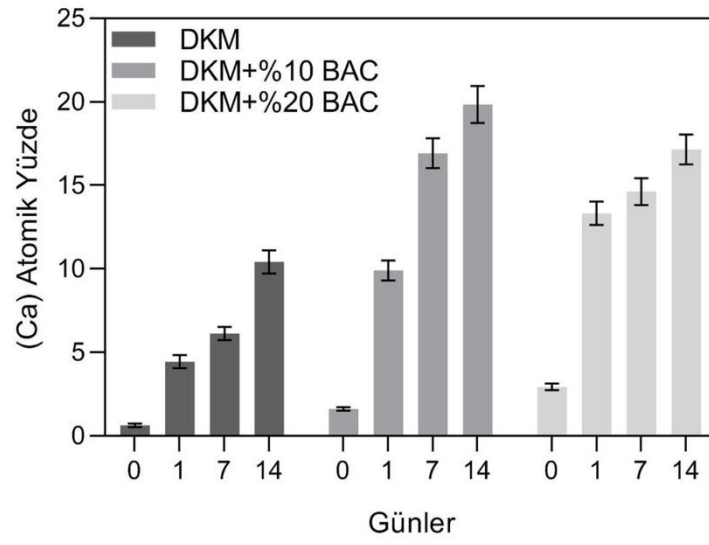
4.4.1 Biyoaktivite testi

Geliştirilen DKM hidrojel ve BAC kompozit yapılarının 37 °C’de çapraz bağlanması ile oluşturulan iskeleler liyofilize edilerek 0, 1, 7, 14 gün boyunca SBF çözeltisine daldırılmıştır. SBF’ye 14 güne kadar daldırılan DKM, DKM-%10 BAC, DKM- %20 BAC numunelerinin SEM bulguları **Şekil 4.8**’de verilmiştir. Tüm malzemelerin başlangıçta özgün gözenekli bir mikro mimariye sahip olduğu görülmüştür. SEM görüntüleri 1 günlük SBF’de bekletilen DKM+%10 BAC, DKM+%20 BAC biyomalzemelerinin yüzeyinde, DKM’ye kıyasla önemli miktarda çökeltme oluştuğunu göstermiştir. BAC kompozit yapılarının 14 günlük inkübasyonundan sonra tamamen çökelti ile kaplandığı görülmüş ve yine bekleme süreleri ile artan çökelti yapıları kompozit malzemelerin gözenek çaplarını daraltmıştır.

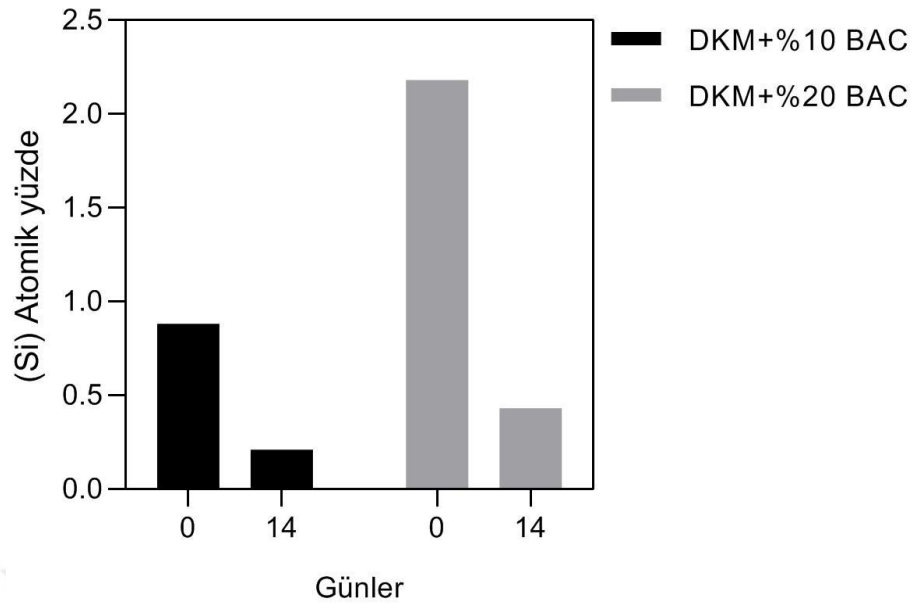


Şekil 4.8 1, 7 ve 14 gün SBF’de bekletilen malzemelere ait 500x büyütmede SEM görüntüleri

Numunelere EDS analizi yapılarak elementel yapıları araştırılmıştır. EDS analizi sonrası elementlere ait atomik yüzdelere incelenmiştir. Bulgularda SBF maruziyeti ile beraber kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) ait atomik yüzdelere arttığı gözlemlenmiştir (**Şekil 4.9**). SEM ve EDS analizlerinin sonuçlarına bakıldığında, malzemelerin yüzeyinde biriken çökeltilerin SBF bekleme süreleri ile beraber artan kalsiyum (Ca) ve fosfat (P) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. EDS sonuçlarına göre, 14 gün SBF’de bekletilen DKM+%10 BAC ve DKM+%20 BAC kompozitlerinin içeriğinde bulunan BAC’dan kaynaklanan silisyum (Si) atomik yüzdelere değişimi **Şekil 4.10**’da verilmiştir. Si atomik yüzde verileri incelendiğinde, 14 gün sonunda DKM+%10 BAC ve DKM+%20 BAC kompozitlerinin ihtiva ettiği Si atomik yüzdesinin azaldığı belirlenmiştir. Bu azalma oranı DKM+%10 BAC kompoziti için %76.13, DKM+%20 BAC kompoziti için %80.27 olarak bulunmuştur.



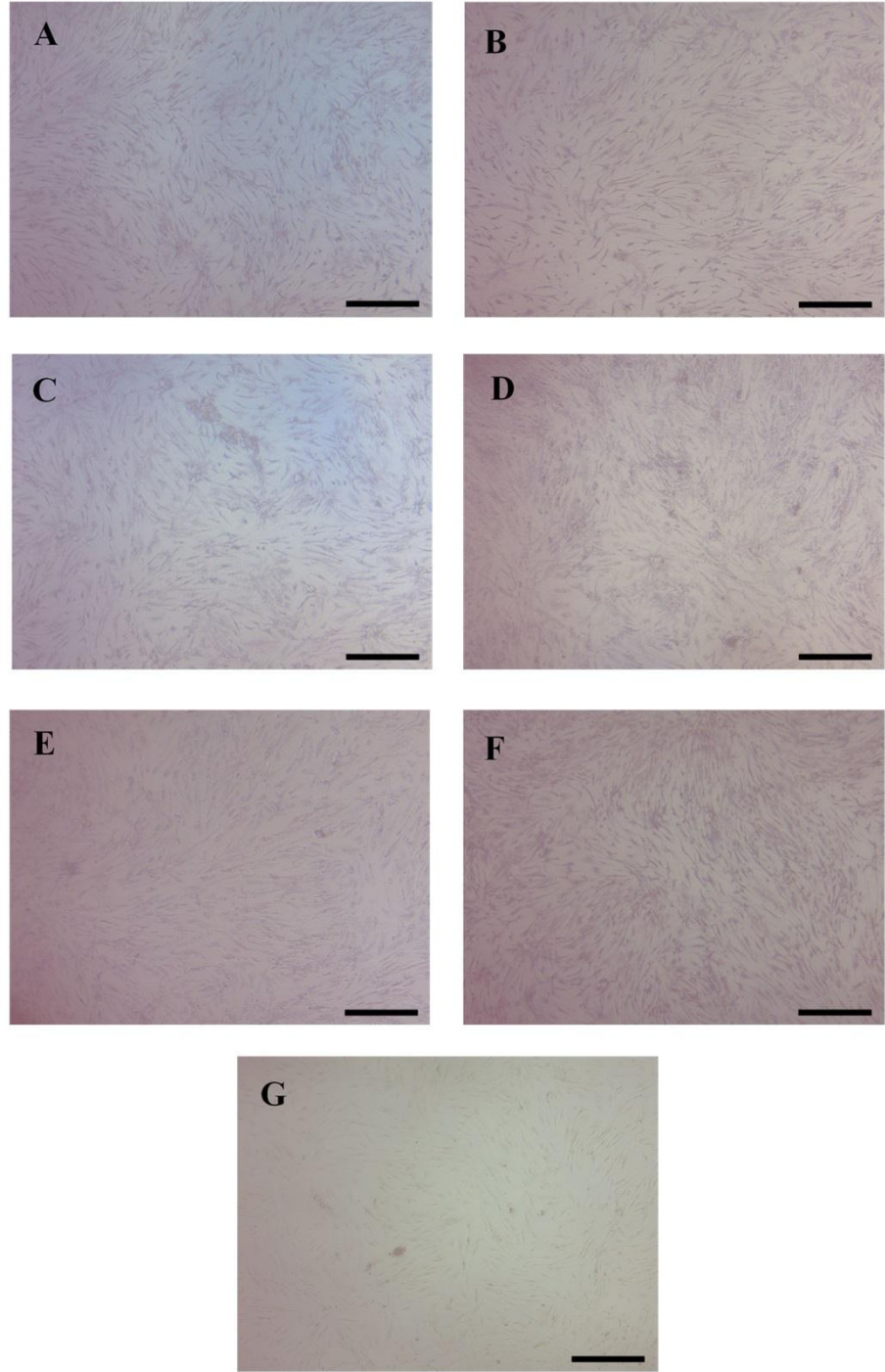
Şekil 4.9 EDS analizi ile belirlenen Ca ve P atom yüzdelерinin SBF maruziyet sürelerine göre gruplardaki değişimi



Şekil 4.10 EDS analizi ile belirlenen Si atom yüzdesinin SBF maruziyet sürelerine göre gruplardaki değişimi

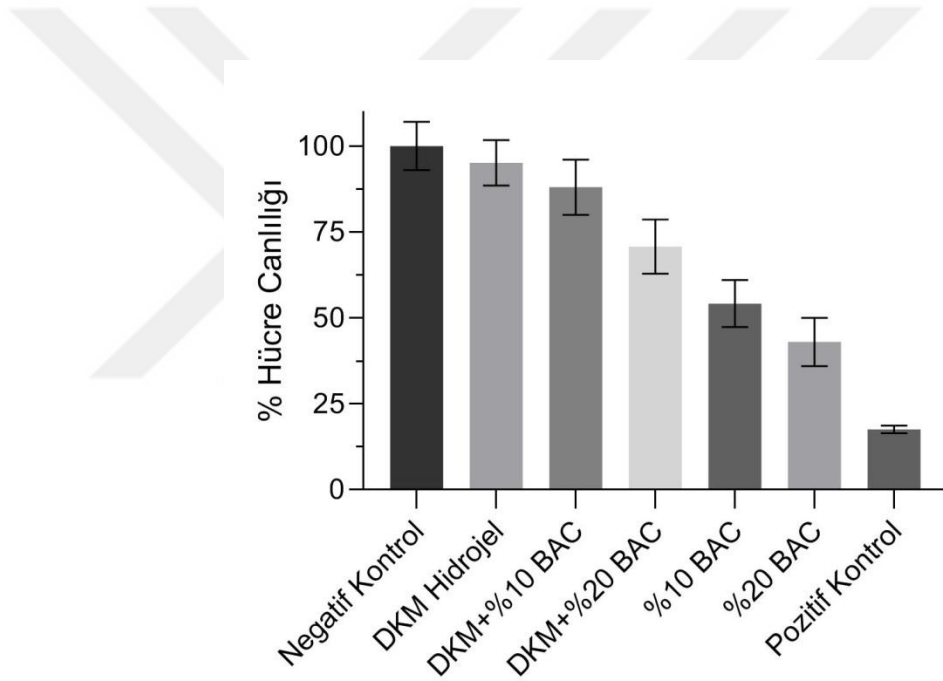
4.4.2 Sitotoksosite testi

DKM/ DKM-BAC/ BAC yapılarının toksisite testleri, ISO 10993-5 (Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi) standardına uygun olarak yapılan *in vitro* Sitotoksosite Analizi ile incelenmiştir. Belirtilen deney gruplarının MTT testi sonrası faz-kontrast mikroskopunda alınan görüntüleri Şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.11 Deney ve kontrol gruplarının MTT boyaması ile birlikte tetrazolyum tuzunun mor renkli formazan kristallerine dönüşümü sonrası faz kontrast mikroskobu görüntüleri. DKM hidrojel (A), DKM+%10 BAC (B), DKM+%20 BAC (C), %10 BAC (D), %20 BAC (E), negatif kontrol (F), pozitif kontrol (G) örnekleri. Boyut çubuğu: 250 μ m.

570 nm’de absorbans ölçümleri yapılan deney gruplarının kantitatif MTT sonuçları **Şekil 4.12**’deki grafikte verilmiştir. Yüzde değerleri üç tekrarlı deney gruplarının ortalaması alınarak oluşturulmuştur. Verilere göre en yüksek canlılık yüzdesi (%100) negatif kontrol grubuna ait iken, en düşük canlılık yüzdesi (%17,55) pozitif kontrol grubunda gözlemlenmiştir. Oluşturulan deney gruplarının canlılık yüzdeleri incelendiğinde, yüksek canlılık yüzdeleri DKM ve DKM + %10 BAC gruplarına aittir. DKM + %20 BAC grubuna ait canlılık yüzdesi ISO 10993-5 standardında belirtilen %70 toksisite sınır değerine yakın olarak bulunmuştur. % 10 BAC ve % 20 BAC grupları belirtilen toksik sınır değerinin altında olmakla beraber hücre canlılığı, miktar artışı ile giderek azalmıştır.

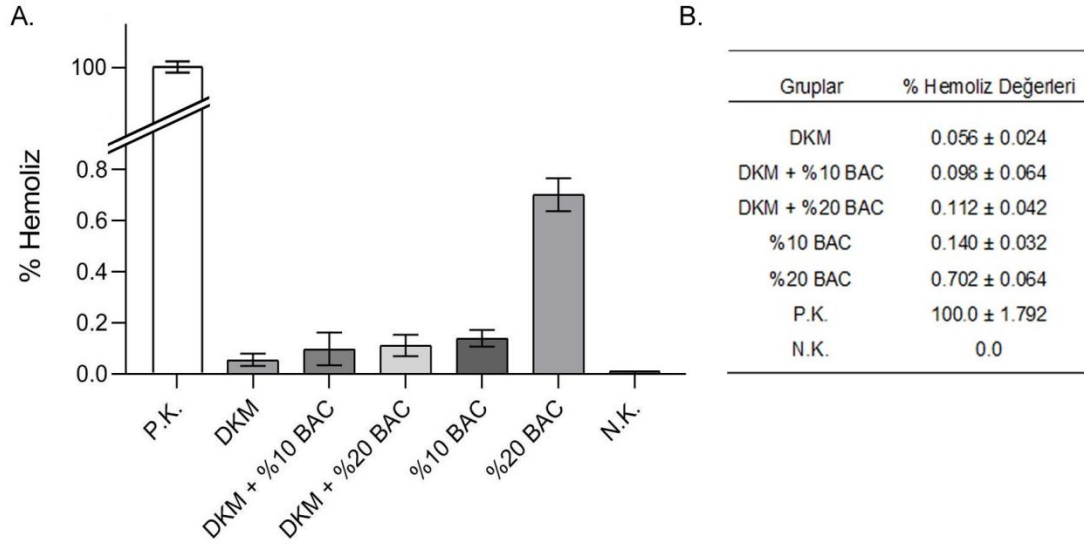


Şekil 4.12 Deney gruplarının *in vitro* sitotoksosite testi bulgularına göre %Hücre canlılığı verileri

4.4.3 Hemoliz (Kan uyumluluğu) testi

Biyomalzemelerin hemoliz (kan uyumluluğu) testi kapsamında 545 nm dalga boyunda alınan absorbans ölçümlerinden elde edilen sonuçlar ile oluşturulan grafik **Şekil 4.13**’de verilmektedir. Test, her grup için 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar dikkate alındığında en düşük hemoliz değeri pozitif kontrolde, en yüksek değer ise negatif

kontrolde görülmüştür. Örneklerin etkileştirildiği kanın yüzde hemoliz değerleri dikkate alındığında tüm gruplarda bu değerlerin pozitif kontrole kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu gözlenmektedir.

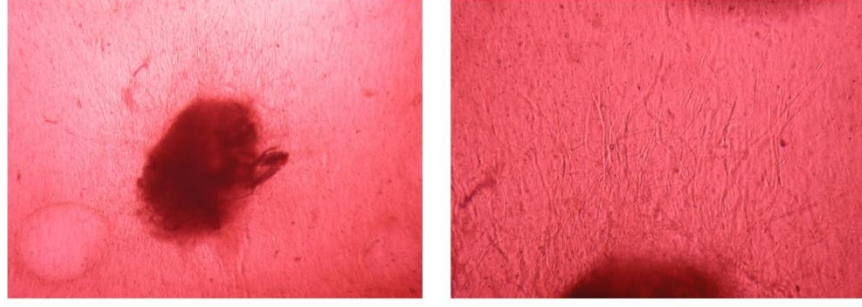


Şekil 4.13 (A) Çalışma gruplarının %Hemoliz grafiği. (B) Gruplara ait %Hemoliz değerleri

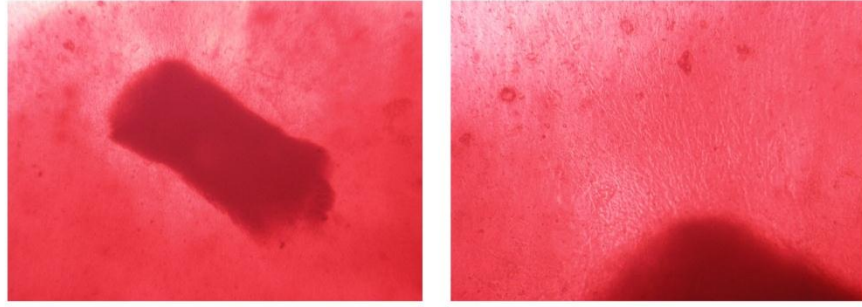
4.5 Ex vivo Embriyonik TAH Çalışması Bulguları

Temin edilen fertilize tavuk yumurtalarının uygun koşullarda inkübasyonu sonrası embriyoların 14. güne kadar gelişimi sağlanmış, ardından ilgili aortik yapıları cerrahi işlem uygulanarak çıkarılmıştır. Aortik yapılardan kesilerek çıkarılan 1 mm'lik halkalar daha sonra DKM, DKM+%10 BAC, DKM+%20 BAC malzemelerin içine gömülerek 5 gün boyunca inkübe edilmiş ve fotoğraflanmıştır (**Şekil 4.14**). İlgili fotoğraflarda bulunan endotel filizlerinin yoğunluğu ImageJ yazılımı kullanılarak işlenmiş ve analiz edilmiştir (**Şekil 4.15**).

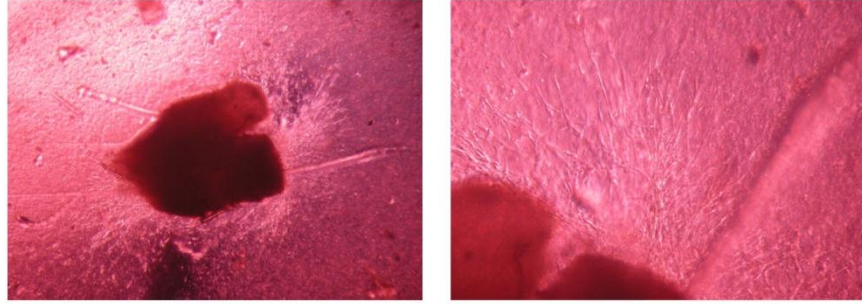
A) DKM Hidrojel



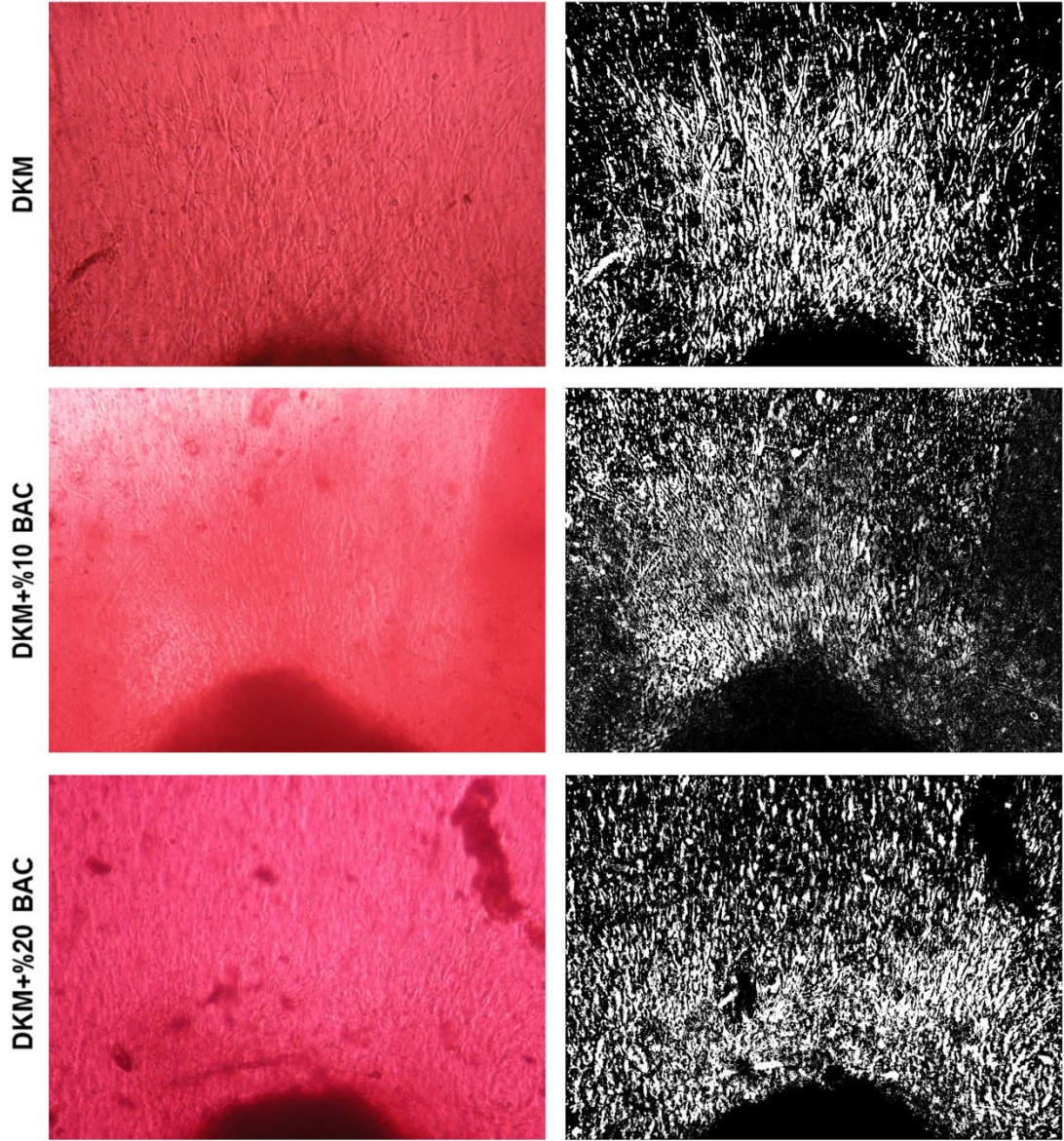
B) DKM + %10 BAC



C) DKM + %20 BAC



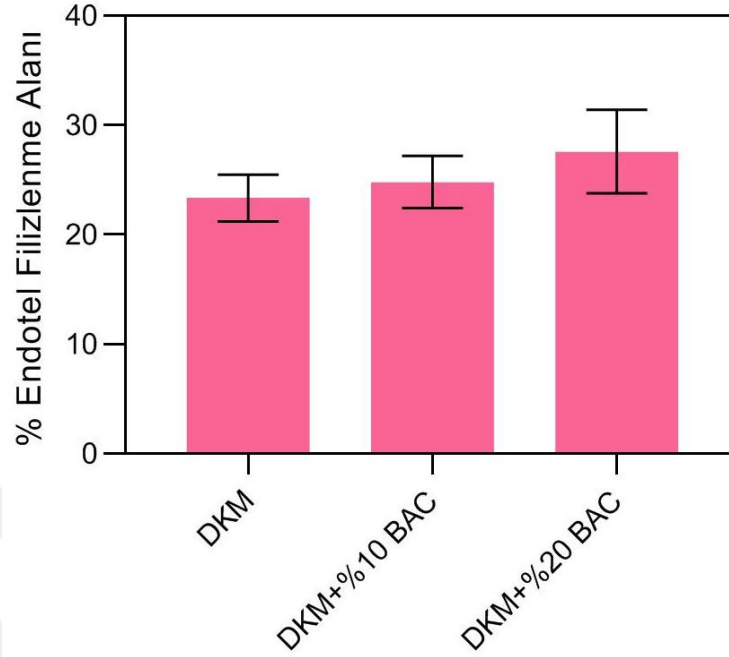
Şekil 4.14 TAH modeli çalışmasında ilgili biyomalzemelere gömülen aortik halkaların ve gelişen endotel filizlerin 5. güne ait fotoğrafları



Şekil 4.15 TAH Modeli çalışmasında gözlenen endotel filizlere ait işlenmemiş fotoğraflar ve eşik ayarlama işlemi sonrası ölçüm alınan fotoğrafların görünümü

Çalışma bulguları incelendiğinde, DKM ve DKM/BAC kompozitlerinin tamamında endotel filizlenmenin gerçekleştiği gözlenmiştir. Biyomalzemeler herhangi bir anti- anjiyogenik yanıt geliştirmemiştir. Gerçekleştirilen endotel filizlenme alanı analizine ait yüzde değerleri 3 tekrarlı deney gruplarının ortalaması alınarak oluşturulmuştur (Şekil 4.16). İlgili ortalama yüzde değerleri, DKM (%23,35), DKM+%10 BAC (24,8), DKM+%20 BAC (27,59) olarak bulunmuştur. Veriler incelendiğinde, endotel

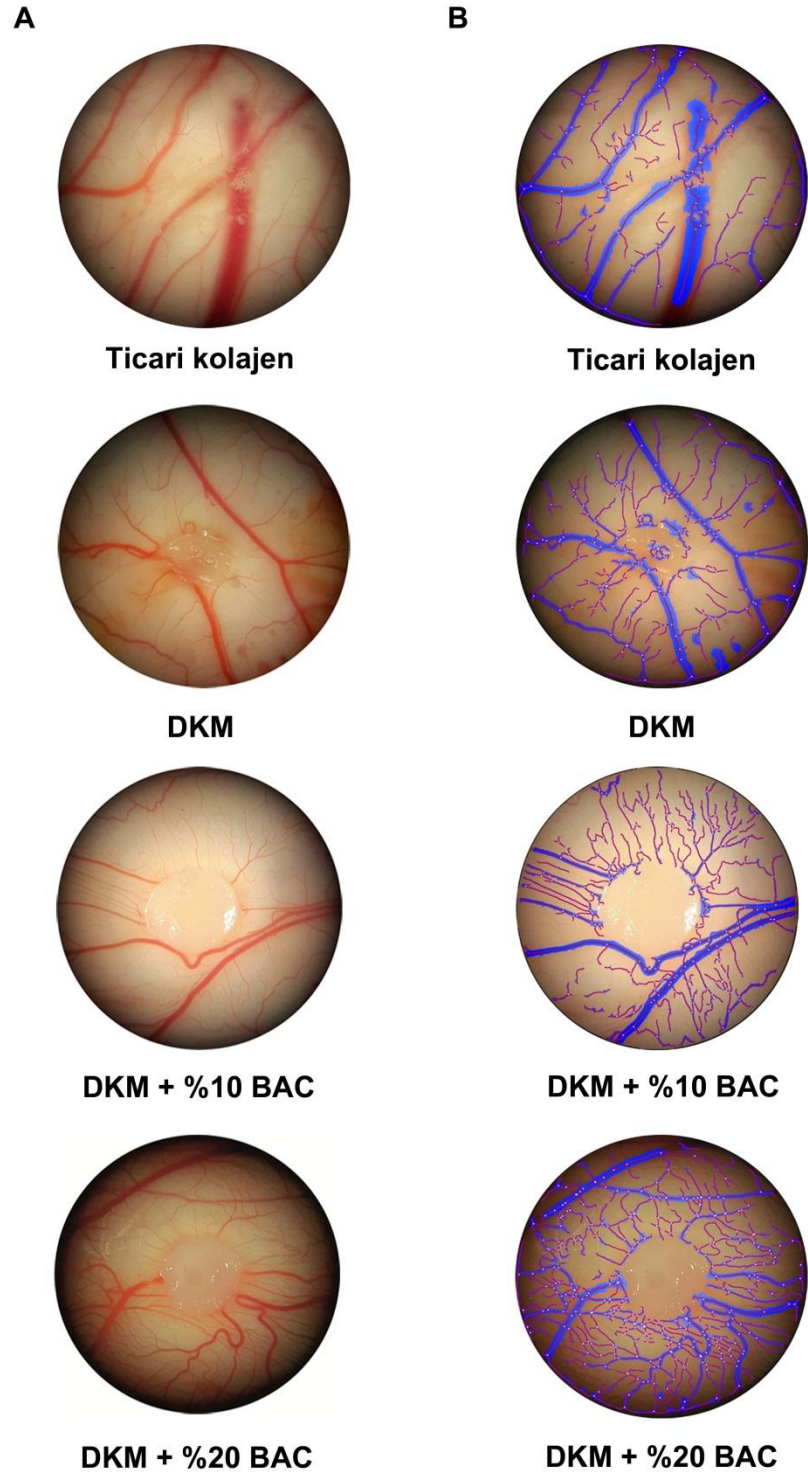
filizlenme yoğunluğu en yüksek olan grubun DKM+%20 BAC kompoziti olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.16 İlgili gruplara ait endotel hücrelerin filizlenme alanı grafiği.

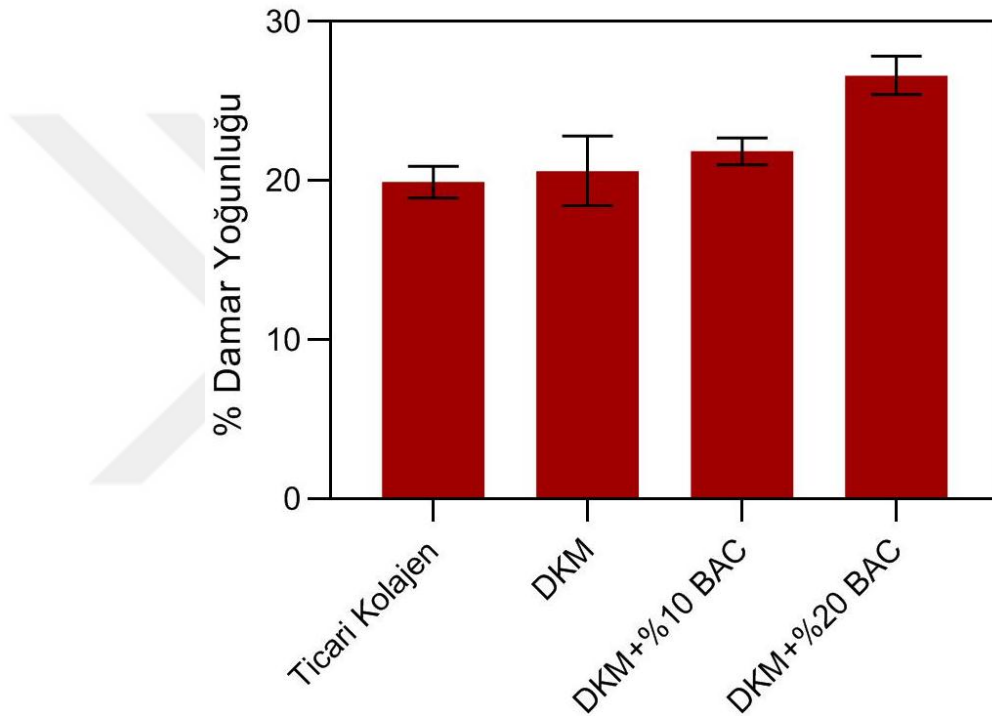
4.6 *Ex ovo* KAM Çalışması Anjiyogenik Özelliklerin Belirlenmesine Yönelik Bulgular

Embriyonik gelişimin 12. gününde olan fertilize tavuk yumurtalarının, EG 7’de ilgili KAM dokusuna implante edilen DKM, DKM + %10 BAC ve DKM + %20 BAC biyomalzemeleri mikroskop altında incelenmiş ve ardından fotoğrafları alınmıştır. İlgili fotoğraflar Adobe photoshop, ImageJ yazılımı ile işlendikten sonra AngioTool yazılımı ile analiz edilmiştir. Analiz sonrası elde edilen verilerin karşılaştırılması için ilgili fotoğraflar ayrıca kan damarı yoğunluğu ve dallanma noktalarının analizi için Onimagin Technologies SCA (Cordoba, İspanya) firmasına gönderilmiştir (Şekil 4.17).



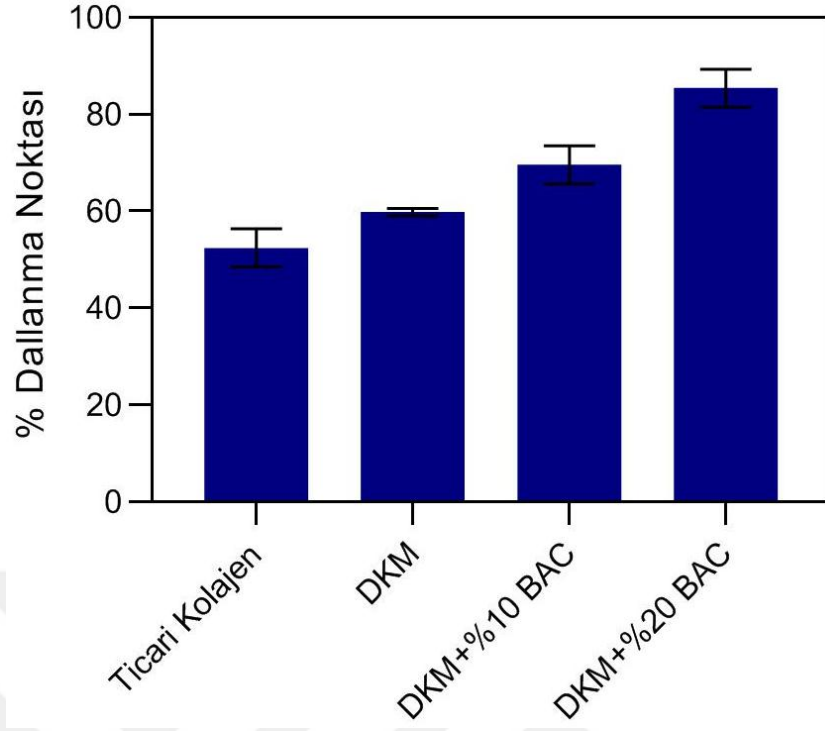
Şekil 4.17 A. EG 12’de görüntülenen biyomalzeme ve ilgili KAM dokusu
B. Fotoğrafların analiz sonrası kan damarları ve dallanma noktaları

Elde edilen sonuçlar DKM hidrojeline artan konsantrasyonlarda BAC ilavesinin, embriyolu tavuk yumurtalarının KAM dokusunda damar yoğunluğunu artırdığını göstermiştir (**Şekil 4.18**). Yüzde damar yoğunluğu implante edilen malzemeye göre ticari kolajen (%19,9), DKM (%20,6), DKM + %10 BAC (%21,8) ve DKM + %20 BAC (%26,6) değerlerine sahiptir. DKM + %20 BAC kompozitinin kontrol grubu olarak kullanılan ticari kolajene kıyasla (% 6,7), DKM hidrojeline kıyasla (%6) daha fazla damar yoğunluğuna sahip olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.18 Biyomalzemelere ait yüzde damar yoğunluğu grafiği.

Biyomalzeme implantasyonu yapılan ilgili KAM dokusu görüntüleri, belirli bir bölgede vaskülerizasyonun sağlanması için önemli olan dallanma noktası oranları bakımından da analiz edilmiştir. Elde edilen veriler damar yoğunluğundaki artışa paralel şekilde bir artış olduğunu göstermiştir. Yüzde dallanma noktası verileri ticari kolajen, DKM, DKM + %10 BAC ve DKM + %20 BAC için sırası ile %52,4, % 59,8, %69,6 ve %85,4 olarak saptanmıştır (**Şekil 4.19**).

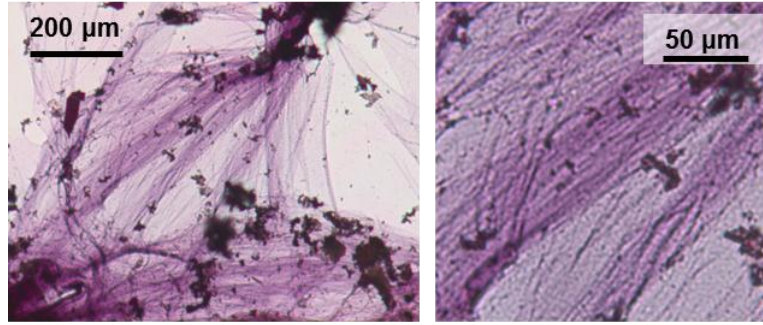


Şekil 4.19 Biyomalzemelere ait yüzde dallanma noktası grafiği.

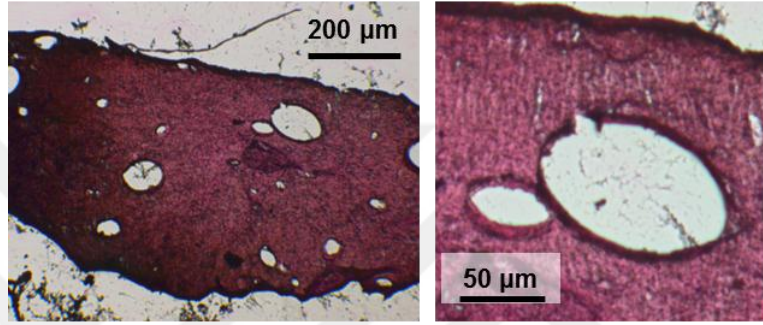
4.6.1 Ex ovo KAM Çalışması Histolojik Bulguları

Kan damarı oluşumu, enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve KAM/biyomalzeme entegrasyonunu incelemek amacıyla kriyostat ile kesit alınan KAM ve çalışılan biyomalzeme örneklerinin H&E boyamaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.20). Boyama sonrası mikroskopta numunelere ait kesitler incelendiğinde kontrol grubu olarak kullanılan ticari kolajenin geçen süre içerisinde stabilitesini koruyamadığı ve dağınık bir yapı sergilediği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra DKM, DKM+%10 BAC ve DKM+%20 BAC yapılarının tümünde hafif enflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenirken küçük kan damarı oluşumunun artan BAC konsantrasyonları ile beraber arttığı belirlenmiştir.

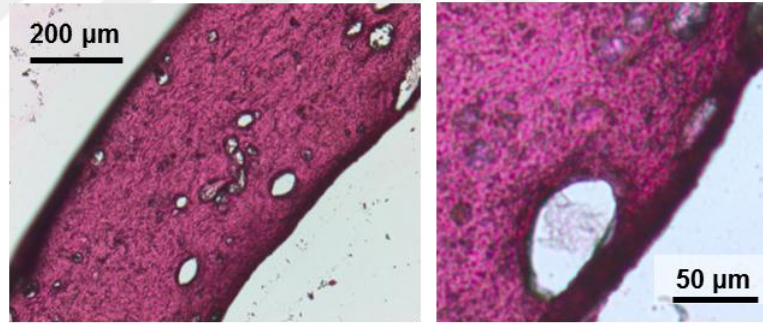
Kolajen



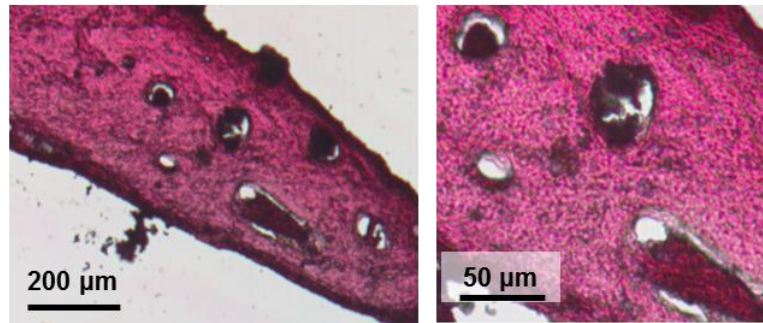
DKM



DKM+%10 BAC



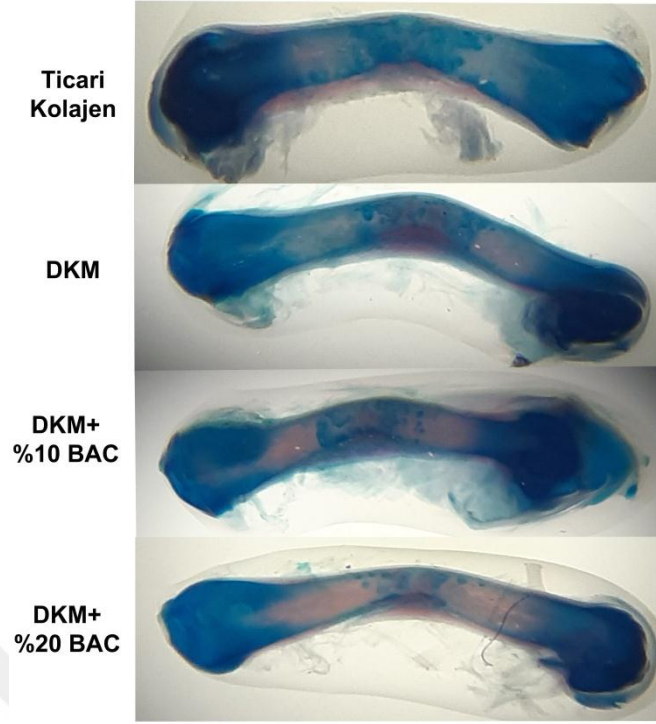
DKM+%20 BAC



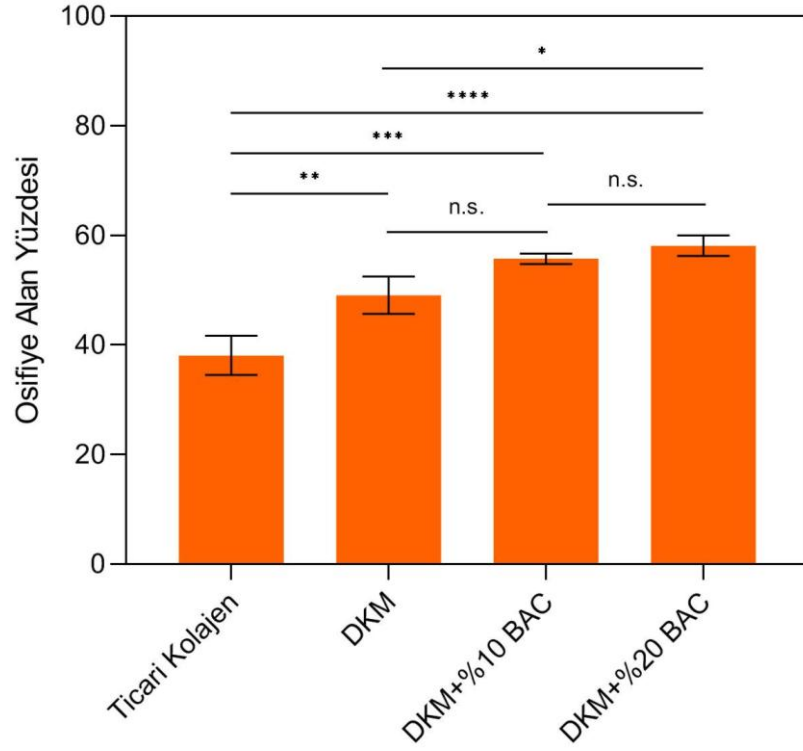
Şekil 4.20 KAM dokusundan çıkarılan biyomalzemelere ait kesitlerin H&E boyama sonrası görüntüleri

4.7 Osteogenez Çalışması Bulguları

Tez kapsamında geliştirilen DKM hidrojel, DKM+%10 BAC ve DKM+%20 BAC biyomalzemelerinin *ex ovo* embriyonik tavuk KAM dokusu implantasyonu sonrası osteogenik özelliklerinin belirlenmesi için osteogenez çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışmalar embriyonik gelişimin 12. gününde embriyolara ait arka uzuvların çıkarılması sonrası Alsiyen mavisi ve Alizarin kırmızısı ile boyamaları yapılarak gerçekleştirilmiştir (**Şekil 4.21**). Boyamaların ardından uzuvlara ait osifiye alanların belirlenmesi için stereo mikroskop ile alınan fotoğraflar ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Görsel inceleme ve analiz sonrası osifiye alanlara ait yüzde değerler 3 tekrarlı deney gruplarının ortalaması alınarak oluşturulmuştur (**Şekil 4.22**). Sonuçlar incelendiğinde, ilgili osifiye alan yüzdeleri kolajen (%38,07), DKM hidrojel (%49,06), DKM+%10 BAC (%55,74) ve DKM+%20 (%58,09) olarak bulunmuştur. Kontrol grubu olarak kullanılan ticari kolajene kıyasla tüm gruplarda osifiye alan yüzdesi daha yüksek bulunmuştur. Gruplar arasındaki fark incelendiğinde, DKM+%20 BAC uygulanan KAM dokusu ile ilişkili olarak kemikleşmenin kontrol grubuna göre belirgin düzeyde arttığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra DKM hidrojeli-DKM+%10 BAC ve DKM hidrojeli+%10 BAC-DKM+%20 BAC grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Çalışma bulguları BAC ilavesinin dolaylı olarak kemikleşmeye katkıda bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 4.21 İlgili gruplarda Alsiyen mavisi ve Alizarin kırmızı ile boyanan femurlara ait görüntüler



Şekil 4.22 Osifiye alan yüzdesi grafiği
(* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$, n:3)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek, anjiyogenik özellikte kompozit biyomalzeme geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, deselülerize kemik matriks hidrojel ve biyoaktif cam içeren kompozit biyomalzeme geliştirilerek, farklı konsantrasyonları ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen kompozit malzemeler fiziksel ve kimyasal olarak karakterize edilmiş ardından biyolojik uyumluluk testleri yapılmıştır. Geliştirilen kompozit biyomalzemelerin anjiyogenik özellikleri *ex vivo* TAH modeli ve *ex ovo* embriyonik tavuk KAM modeli kullanılarak tayin edilmiştir. Biyomalzemelerin osteojenik özelliklerinin belirlenmesi kapsamında *ex ovo* embriyonik tavuk KAM modeli çalışması sonrasında osteogenez çalışmaları gerçekleştirilerek osifiye alanlar analiz edilmiştir.

Dokularla temas ettiğinde belirli yüzey reaksiyonları sonucu hidroksiapatit benzeri bir tabakanın oluşumuna yol açan ve bununla beraber sert ve yumuşak dokular ile sağlam bağlar oluşturabilen biyoaktif malzemeler arasında incelenen silikat biyoaktif camlar biyomedikal uygulamalar için potansiyeli bulunan ilgi çekici malzemeler durumundadır (Rahaman vd. 2011). Silikat biyoaktif camlar arasında 45S5 veya ticari adı ile Bioglass®; sergilediği biyouyumluluk, kemik dokusuna bağlanma ve kemik doku gelişimini uyarmasının keşfi ile beraber çeşitli bileşimler ve ticari isimler ile özellikle travma, konjenital kusurlar ve osteoporoz ya da tümör oluşumu ile ilgili kemik kusurlarının giderilmesinde çene, diş ve ortopedik cerrahi uygulamalarında yer edinmiştir (Jones 2013). Bunun yanısıra geçtiğimiz 15 yılda biyoaktif camlar ile yapılan çalışmalar, doku rejenerasyonu ve yumuşak dokularda yara iyileşmesinde rol alan anjiyogenezi teşvik edici özelliklerinin bulunduğunu göstermektedir (Day 2005, Miguez-Pacheco vd. 2015). Biyoaktif camlar, anjiyogenik özelliklerin teşvik edilmesi amacıyla kullanımına başvuru VEGF, bFGF gibi büyüme faktörleri, gen ve hücre terapileri gibi pahalı yaklaşımlara bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Düşük konsantrasyonda 45S5 biyoaktif cam partiküllerinin hücre çoğalması ve neovaskülerizasyonu artırdığı yapılan daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Vargas vd. 2013, Yu vd. 2016)

Biyoaktif camların üretiminde iki temel yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan ilki silika, kalsiyum, fosfat ve sodyum oksitlerinin (45S5; % 46.1 SiO₂, % 24.4 Na₂O, % 26.9 CaO ve % 2.6 P₂O₅, mol olarak) 1300 °C veya üzerinde platin pota ve grafit kalıbı (çubuklar veya monolitler için) veya su (frit) içinde eritilmesi esasına dayanan geleneksel ergitme yöntemi, bir diğeri ise bileşimdeki öncülleri içeren çözeltinin, jel yapısı oluşturmak için oda sıcaklığı gibi daha düşük sıcaklıklarda polimer tipi reaksiyonlara girerek oluşturduğu ve daha sonra kurutulabilen kimya temelli bir sentez yolu olan Sol-Jel yöntemidir (Kaur vd. 2016). Sol-Jel türevli biyoaktif camların, doğal nano ve mikro gözenekliliğe sahip olma eğilimi ile fizyolojik ortamı daha iyi simüle edebilme ve yüksek yüzey alanı oluşturmaları sebebiyle ergitme yöntemine kıyasla daha hızlı bozunma özelliği sergiledikleri belirtilmektedir (Lucas-Girot vd.2011, Baines vd. 2018). Bu tez çalışmasında, ilgili bilgiler ışığında asit katalizli Sol-Jel yöntemi kullanılarak 45S5 biyoaktif cam seramikleri üretilmiştir (Pirayesh ve Nychka 2013, Zheng vd. 2015). 700 °C’de stabilize edilen jelden türetilmiş 45S5 cam seramiklerin XRD analiz sonuçları incelendiğinde ana kristal faz (Na₂Ca₂Si₃O₉) ve ikincil kristal faz olan [Na₂Ca₄(PO₄)₂SiO₄]’a ait pikler gözlemlenmektedir. Bu belirgin silikat ve fosfat kristal fazları, malzemenin literatürdeki örneklerini destekler niteliktedir (Cacciotti vd. 2012, Touri vd. 2013). Sentezlenen 45S5 biyoaktif cam malzemenin fonksiyonel gruplarının kantitatif olarak tayin edilmesi için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında sol-jel yöntemi ile sentezlenen 45S5 biyoaktif cama ait spektrumdaki pikler, 45S5 Bioglass® ve sol-jel türevli 45S5 biyoaktif cam seramik malzemeler üzerinde yapılan çalışmalardaki bulgular ile örtüşen spektral özellikler göstermektedir (Zheng vd. 2015).

Biyoaktif cam parçacıklarının fizyolojik sıvılar ile olan etkileşimi, malzeme yüzeyinde iyon filtrasyonu/ değişimi, camla ilişkili yapıların bozunumu ve kalsiyumdan yoksun karbonatlı apatit yüzey tabakasının çökmesi ve büyümesi gibi kimyasal reaksiyonlara ve ardından hücrelerin kolonizasyonu, proliferasyonu ve ilişkili hücre yapılarının farklılaşması ile bir takım hücresel reaksiyonların gerçekleşmesine sebebiyet vermektedir (Gerhardt ve Boccaccini 2010). Bu durum dikkate alındığında biyoaktif camlarda parçacık boyutlarının bozunma hızları ve ilişkili iyonik yapıların salımı ile doğrudan ilgili olduğu, dokularda mikro ve nano yapıları biyoaktif camların kullanımının

artan biyoaktiviteye sebebiyet verdiği belirtilmiştir. Klinik uygulamalarda kan gibi biyolojik sıvılar ile karıştırılmaya uygun ve düzensiz şekilli kusurlu bölgelere sıkıştırılabilirmeleri sebebiyle partikül ve granül şeklinde, bir çoğu ticari olarak 90-1000 µm aralığında kullanıma sunulmaktadır (Qazi vd. 2017, Kargozar vd. 2018). Partikül boyut etkinliği göz önüne alınarak tez çalışması kapsamında dövülüp sonrasında elekten geçirilerek elde edilen 63 mikron ve altı biyoaktif cam mikropartikülleri kullanılmıştır. Literatürde yer alan çalışmalar, biyoaktif camlar gibi birçok mikron ve mikron altı partiküllerden yararlanmak, dokularda güvenilir aktarımını sağlamak ve salımını kontrol etmek amacıyla uygun formülasyona sahip polimer bazlı taşıyıcı yapılara dahil edilmesini içermekte ve biyoaktif cam partiküllerinin kompozitlerinin oluşturulmasının, mekanik ve biyolojik özellikleri iyi yönde etkilediğini vurgulamaktadır (Quinlan vd. 2015, Wu vd. 2019).

Çalışmada biyoaktif cam mikropartiküllerinin ekleneceği yapı olarak sığır süngerimsi kemik dokusu seçilmiş ve hücresizleştirilerek hidrojel formunda üretilip kullanılması amaçlanmıştır. Hücresizleştirilmiş sığır kemik dokusu daha önce literatürde etkinliği bilinen protokol uygulanarak üretilmiştir (Sawkins vd. 2013, Parmaksız vd. 2021). Öncelikle sığır kemik dokusu işlem etkinliğini artırmak amacıyla küçük parçalara ayrılmış ve ardından asit muamelesi ile içeriğinde bulunan inorganik mineralize yapı uzaklaştırılmıştır. Yapıda kalan lipidlerin uzaklaştırılması için kloroform/metanol çözeltisi ile yıkama yapılarak çözelti yapıdan distile su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Elde edilen demineralize kemik matriks yapısı dondurulup liyofilize edilerek bir sonraki aşama olan hücresizleştirme işlemine geçilmiştir. Hücresizleştirme işlemi için tripsin/EDTA içeren çözeltide 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Elde edilen deselülerize kemik matriks yapısı hücresel kalıntıların uzaklaştırılması için penisilin/streptomisin içeren PBS içerisinde 24 saat karıştırılmış ve ardından dondurularak liyofilize edilmiştir. Deselülerizasyon etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla DKM yapılarının DNA miktarı tayini, sGAG analizi ve kolajen içeriği analizleri yapılmıştır. Deselülerizasyon işlemi sonrası olumsuz hücre ve konak tepkilerinin önlenmesi amacıyla DNA kalıntılarının olabildiğince uzaklaştırılması ve <50 ng DNA/mg kuru ağırlık miktarına uygunluğu literatürde yaygın olarak kabul görmektedir (Faulk ve Badylak 2014). Spektrofotometrik yöntemle dayanılarak yapılmış olan DNA miktarı

analizi, <50 ng DNA/mg kuru ağırlık sınırı dikkate alındığında uygulanan protokol DNA'nın nerede ise %70'inin bertaraf edildiğini ve miktarın optimal değer aralığında olduğunu göstermiştir (Gilpin ve Yang 2017). Deselülerize matriks yapılarını diğer doğal ve sentetik biyomalzemelerden ayıran başlıca unsur farklı hücre dışı matriks bileşenlerini yapısında barındırmasıdır. Bu sebeple içeriğinde bulunan sGAG ve kolajen gibi ana bileşenlerin incelenmesi deselülerizasyon etkinliğinin değerlendirilmesinde önemlidir (Fernández-Pérez ve Ahearne 2019). Çalışma kapsamında üretilen DKM yapılarının sGAG ve kolajen analizleri yapılarak değerlendirilmiş ve bulgular DKM yapısında sGAG'ların %63,36, kolajenin %64,01 oranında korunduğunu göstermiştir. Bulgular bir arada incelendiğinde, kemik dokusuna uygulanan deselülerizasyon işleminin hücreler ve ilişkili DNA miktarını önemli ölçüde giderirken aynı zamanda içeriğindeki sGAG ve kolajenin büyük oranda korunduğunu göstermiş olup deselülerizasyon protokolünün başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamıştır.

Hücre dışı matriks içeriği büyük oranda sGAG, protein ve kolajenden oluşmaktadır. Temelde içeriğinde bulunan kolajenden kaynaklanan ve kendi kendine birleşme süreci ile karakterize 3 boyutlu hidrofilik polimer ağlar sunan hidrojel biyomalzemelerin eldesine imkan sağlamaktadır (Brightman vd. 2000). Yapılarında bol miktarda su ve biyolojik sıvıyı tutan ve aynı zamanda çözünmeyen polimerik ağ yapılarına sahip hidrojeller; terapötik ajanlar, seramikler ve metal iyonları gibi organik ve inorganik yapıların lokal ve kontrollü salımı için uygun taşıyıcı platformlar sunmaktadır (Tibbitt ve Anseth 2009, Gaharwar vd. 2014). Sunduğu bu gibi avantajlar hücre kültürü, yenileyici tıp ve doku mühendisliği uygulamalarında hidrojel formu biyomalzemelerin kullanımını uygun kılmakta ve literatürde kendine sıklıkla yer bulmaktadır (Zhao vd. 2020, Zeimaran vd. 2021). Tez çalışması kapsamında biyoaktif cam mikropartiküllerinin homojen dağılımı ve iyonik bileşenlerin kontrollü salımını sağlamak için DKM yapıların hidrojel formda üretimi amaçlanmıştır. DKM yapılarını da içeren çeşitli HDM hidrojellerinin üretiminde kullanılan en yaygın yöntem, HDM yapılarının küçük parçalara ayrılan formunun pepsin aracılı enzimatik sindirim ile çözündürülmesi ve ardından fizyolojik pH ve tuz konsantrasyonunun sağlanması ile fizyolojik ortam sıcaklığında polimerize jel formunun oluşturulmasıdır. Hücre dışı matriks hidrojelleri fizyolojik ortam sıcaklığının sağlanması ile, kolajen monomerlerinin

su kaybedip, kümeleşmesi bununla beraber hidrofobik kalıntılarının fibrillerin içine gömülmesiyle oluşan entropideki artışın sebep olduğu bir süreç ile polimerize formunu almaktadır (Hulmes 2008, Saldin vd. 2017). Çalışmada deselülerizasyon etkinliği ve biyoaktif içeriği DNA, sGAG ve kolajen analizleriyle değerlendirilen DKM yapıları daha sonra pepsin aracılı enzimatik sindirim yoluyla literatüre uygun olarak hidrojel formda üretilmiştir. Üretilen viskoz DKM yapısı akabinde 37°C’de bekletilerek nihai polimerize ve viskozitesi yüksek DKM hidrojel elde edilmiştir. Fizyolojik ortam sıcaklığının viskoz DKM yapılarındaki jelleşme kinetiği üzerine olan etkisi dikkate alınarak kompozit yapıların oluşturulmasında, BAC partiküllerinin eklendiği ve hidrojel içinde homojen dağılımın sağlanması için karıştırıldığı aşamalar +4°C’de gerçekleştirilmiştir.

Biyoaktif cam partiküllerinin çözünme hızı ve bununla beraber yüzeylerinden alkali katyonların salınmasıyla daha yüksek pH koşullarının oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir. Bu durum hidrojellerde jelleşme kinetiğini büyük oranda etkilemektedir (Gao vd. 2019, Zhou vd. 2021). Bu bilgiler ışığında yapılan ön çalışmalar kapsamında DKM hidrojel yapılarına kütlece düşük ve yüksek konsantrasyonda BAC mikropartikül eklemeleri yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalara benzer nitelikte DKM hidrojel yapılarına kütlece %20’nin üzerinde BAC eklenmesinin jelleşme kinetiğini olumsuz yönde etkilediği ve polimerize yapının oluşumunu geciktirerek daha viskoz yapıların oluşumuna sebep olduğu gözlenmiştir (Sarker vd. 2016, Pontremoli vd. 2018). Bu nedenle çalışmaya, kütlece %10 ve %20 oranında BAC eklenerek optimize edilen kompozit yapıları kullanılarak devam edilmiştir.

Doku mühendisliği uygulamalarında geliştirilen iskelelerin gözeneklilik ve gözenek boyutu gibi yapısal özelliklerinin *in vitro* ve *in vivo* etkinliklerine doğrudan olan etkisi ayrıntılı olarak incelenmiştir (Loh ve Choong 2013). Araştırma bulguları gözenekli yapı sergileyen iskelelerin, hücrelere uygun mikro ortam sağlayarak hücrelerin çoğalması, göçü, metabolik besin alımı ve atıkların uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Çalışmada üretilen DKM hidrojel ve kompozitlerinin morfolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla SEM analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları incelendiğinde, tüm malzemelerin gözenekli bir yapı sergilediği ve bu durumun

vaskülerizasyonla beraber hücrelerin metabolik aktivitelerinin olumlu yönde etkilenmesine sebep olacağı düşünülmektedir (Medizadeh vd. 2013). Bununla birlikte DKM hidrojelinde görülen 150-250 μm aralığında değişen por çaplarının, artan BAC konsantrasyonları ile beraber azalarak 50-100 μm çaplarında değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Nitekim BAC dahil edilerek üretilen kompozit yapılarda azalan iskele gözenekliliğinin dokularda hücrel ve vasküler infiltrasyon için hala uygun seviyede olduğu düşünülmekte ve desteklenmektedir (Quinlan vd. 2015). Geliştirilen DKM/BAC kompozitlerinin kimyasal yapısının kantitatif değerlendirilmesi amacıyla FTIR yöntemi ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ATR-FTIR tekniği ile DKM hidrojelinin bileşenleri ve kütlece %10 ve %20 oranında BAC eklenen kompozit yapıları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. ATR-FTIR bulguları incelendiğinde, DKM içeriğinde bulunan kolajenden kaynaklanan Amit I, Amit II ve Amit III bunun yanı sıra Amit A ve Amit B tepe noktaları her grupta yoğun tepe noktaları ile karakterize edilmiştir. Kompozit yapılarda, içeriğinde bulunan BAC mikropartiküllerinden kaynaklanan Si-O-Si'a ait tepe noktaları gözlenmiş, bu aynı zamanda DKM yapılarında BAC varlığı ve entegrasyonunu doğrular sonuçlar sergilemiştir.

Elde edilen DKM hidrojel ve %10 ve %20 oranlarında BAC eklenerek hazırlanan kompozit malzemelerin su tutma kapasiteleri değerlendirilmiştir. Çalışma boyunca alınan ölçümlere dayalı olarak %100 oranında yapısında su tutan DKM hidrojeli ve BAC kompozitlerinin zamana bağlı olarak içeriğinde bulunan suyu kaybettiği saptanmıştır. Mevcut kaybın DKM hidrojelinin içinde bulunan yüksek miktardaki Kolajen Tip I ve GAG'ların var olan hacimlerini kaybetmesi ve daha sıkı protein yapıları şeklinde istiflenmesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Makromoleküler kalabalıklaşma olarak adlandırılan bu süreç, makromoleküller tarafından mevcut çözücü hacminin azaltılması ile beraber konformasyonel serbestliği azalan komşu yapıların kümelenerek daha kompakt protein yapıları oluşturması ile karakterizedir. Kolajende kalabalıklaşma aracılı olarak gerçekleşen birleşme eğiliminin, enzimatik parçalanmaya karşı direnç sağlarken, mekanik mukavemet ve hücre proliferasyonunu iyi yönde etkilediği bilinmektedir (Dewavrin vd. 2014, Rashid vd. 2014, Graham vd. 2019). Bunun yanı sıra kompozit yapılarda su kaybının DKM hidrojeline göre daha düşük olduğu, bu durumun kuru kütledeki artış ile doğru orantılı olarak gerçekleştiği

gözlendi. Benzer şekilde artan BAC yapıları ile ilişkili mekanik mukavemetin artmasının bir sonucu olarak, kompozit malzemeler daha sağlam bir şekilde kalabilmiştir (Sarker vd. 2015).

Çalışma kapsamında geliştirilen DKM/BAC kompozitlerinin biyoaktivitesini değerlendirmek amacıyla SBF daldırma testi uygulanmıştır. İnsan kan plazmasının iyon bileşimini taklit eden SBF, çeşitli malzeme türlerinin biyoaktivitesini değerlendirmek için kullanılabilir (Kokubo ve Takadama 2006). Biyoaktivite testi, inorganik biyomalzemelerin SBF maruziyeti sonrası hidroksiapatit oluşum hızının değerlendirilmesi esasına dayanan bir yöntem olarak ele alınmaktadır (Zheng vd. 2015). Biyoaktivite testi malzemenin biyouyumluluğunu değerlendirmek için bir platform sunarken aynı zamanda hidroksiapatit çekirdeklenmesi yoluyla *in vivo* kemik dokusuna bağlanma ve yenilenmesi hakkında fikir edinilmesini sağlamaktadır. Gerçekleştirilen biyoaktivite testi sonrası DKM gözenekli iskelelerin, SEM ve EDS sonuçlarına bakıldığında, 14 gün SBF maruziyeti sonrasında kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) miktarının arttığı saptanmıştır. Fakat bu durum BAC kompozitlerinde daha belirgin ölçüde olmuştur ve DKM temelli hücre dışı matriks yapılarına biyoaktif cam mikropartiküllerini eklemenin, yapı iskelelerinin biyoaktivitesini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Marelli vd. 2011). SBF maruziyeti ile beraber hidroksiapatit benzeri Ca/P çekirdeklenmesinin *in vivo* kemik yenilenmesi üzerindeki olumlu etkileri değerlendirilmiş olsa da, yumuşak dokular ile temas halinde bu durum istenmeyen kireçlenme durumlarına yol açabilmektedir. Bu bağlamda dokularda biyoaktivite ve biyouyumluluğun değerlendirilmesi için tek bir test yöntemi uygulamak yerine, çeşitli *in vitro* ve *in vivo* testler ile bulguları desteklemek önem teşkil etmektedir (Baino ve Yamaguchi 2020).

Doku mühendisliği, rejeneratif tıp gibi uygulama alanlarında kullanılacak olan iskelelerin dokular ve fizyolojik sistemler ile etkileşiminde uyumluluk sergilemesi beklenmektedir (Li vd. 2015). Bu nedenle, biyomalzemelerden üretilen yapı iskelelerinin konakta hasar veya istenmeyen yan etkilere neden olabilecek biyolojik tepkileri saptamak ya da ne düzeyde toksik etkiye sebep olduğunu anlamak için değerlendirilmesi önem teşkil etmektedir. Bu kapsamda biyomalzemelerin; hücrelerin

büyümesi, çoğalması ve morfolojilerine olan etkisini değerlendirmede, ISO 10993-5 (Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi) standardı uyarınca biyomalzemelerin direkt veya özütleri ile hücrelerin kültürünü içeren Sitotoksosite Testi uygulanmaktadır (De Jong vd. 2020). Tez çalışmasında DKM ve kompozit yapılarının biyoyuumluluğunu değerlendirmek amacıyla, malzemelerin bekletildiği besiyeri özütleri hücreler ile etkileştirilerek Sitotoksosite Testi yapılmıştır. Test dâhilinde yapılan MTT analizi sonucunda gözlenen formazan kristallerinin spektrofotometrik absorbans ölçümleri, geliştirilen DKM+%10 BAC ve DKM+%20 BAC kompozit biyomalzemelerin kabul edilen toksisite sınır değeri olan %70'ten yüksek olduğu dikkate alındığında hücreler üzerinde toksik etkinliğinin olmadığı belirlenmiştir. Fakat bu durum sadece %10 ve %20 BAC içeren gruplarda toksik sınır değerin altında bulgular göstermiştir. Literatürde benzer sonuçların elde edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Kütlece %1 ve %5'lik 45S5 Biyoaktif cam içeren aljinat/ jelatin kompozitlerine ait hücre canlılığının incelendiği çalışmada yazarlar, artan BAC oranlarına bağlı olarak yüzeyden yüksek miktarda iyon salımının hücreler üzerinde toksik etkiye yol açtığını belirtmiştir (Sarker vd. 2016). Yapılan bir diğer çalışmada enjekte edilebilir formda üretilen Gellan zamkı ve farklı kimyasal formülasyonlara sahip BAC kompozitlerinin hücre uyumluluk etkinliği MTT testi ile değerlendirilmiş, araştırma bulgularında yüksek Ca^{+2} iyon içeriğine sahip kompozisyonların sitotoksik etkiye sebep olduğu gösterilmiştir (Douglas vd. 2014). Bulgulardan yola çıkılarak kompozit biyomalzemelerdeki DKM hidrojel malzemenin BAC yüzeyinden iyon salımını geciktirdiği ve bu durumun hücre canlılığı açısından olumlu etkiye sebep olduğu söylenebilir.

Geliştirilen biyomalzemelerin hücreler üzerindeki etkinliğinin yanı sıra temas ettiği fizyolojik sistemlerdeki güvenilirliğini belirlemek için kan gibi vücut sıvıları ile temasının da değerlendirilmesi klinik uygulamaları için önemli bir husustur (Hasirci ve Hasirci 2018, Ozturk vd. 2020). Bu bağlamda, kan ile temas eden biyomalzemelerin kan bileşenlerinin aktivasyonuna veya tahribatına neden olması ve olumsuz etkileşmesi istenmeyen durumlardır (Weber vd. 2018). Bu nedenle tez kapsamında geliştirilen kompozit biyomalzemelerin kanla teması halinde eritrositler üzerindeki yıkım etkisini değerlendirmek amacıyla, kabul gören ISO 10993-4 (Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi) standardına uygun bir şekilde biyomalzemeler doğrudan kan ile

etkileştirilerek Hemoliz Testi yapılmıştır (Stang vd. 2014). Standart uyarınca etkileştirilen biyomalzemeye ait absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan yüzde hemoliz verileri %0-2 aralığında hemolitik olmayan, %2-5 aralığında hafif hemolitik ve %5'in üzerinde hemolitik olarak sınıflandırılmaktadır. Hemoliz temelde eritrosit hasarı sonucu plazmada hemoglobin artışı ile karakterize bir süreç olup, gerçekleşmesi halinde doku ve organlara *in vivo* oksijen taşınımının azalması ve toksisitenin artması gibi ciddi sonuçlara sebebiyet verebilmektedir (Qian vd. 2010). Gerçekleştirilen hemoliz testi sonuçları incelendiğinde, DKM, DKM ve BAC kompozitleri ve sadece BAC'ye ait hemoliz yüzdeleri 0-2 değer aralığında olup, standart uyarınca hemolitik olmayan biyomalzemeler olarak değerlendirilmişlerdir (Durgalakshmi vd. 2020).

Pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik özelliklerin belirlenmesinde *ex ovo* modeller arasında incelenen Aortik Halka Modeli (AHM), endotel hücrelerin dallanması ve yeni mikro kılcak damar yapılarının oluşmasına izin veren, tekrarlanabilirliği ve düşük maliyetli olması ile araştırmacıların tercih ettiği bir yöntemdir (Auerbach ve Muthukkaruppan 2012). Aortik halka yapıları sadece endotel hücreleri değil, damar yapısında bulunan diğer hücreleri ve görece düşük te olsa hücre dışı matriks yapısını ihtiva ettiği için *in vivo* şartlardaki anjiyogenik süreçleri *in vitro* anjiyogenez modellerinden daha iyi ifade edebilmektedir (Auerbach vd. 2003). Nicosia vd. 1982'de sıçan aortları ile AHM'nin öncül çalışmalarını gerçekleştirmiştir. Daha sonra bu model insan dahil olmak üzere, fare, tavuk ve tavşan gibi farklı türler için uyarlanarak sürdürülmüştür. Genellikle aortik doku eksplantlarının kolajen, fibrin ve bazal membran jellerine (Matrigel) gömülmesi ile sürdürülen, anjiyogenik mekanizmaların araştırılmasına izin veren AHM, geliştirilen biyomalzemelerin anjiyogenik özelliklerini incelemeye olanak tanımaktadır (Miller vd. 2010, Mangır vd. 2019). Bu kapsamda tez çalışmasında geliştirilen DKM ve DKM/BAC kompozitlerinin anjiyogenik etkinliğinin araştırılmasında *ex vivo* TAH modeli kullanılmıştır. Çalışma sonunda fotoğraflanan aortik halka parçalarından filizlenen endotel hücreleri ImageJ yazılımı aracılığıyla alansal olarak analiz edilmiştir (Kapoor vd. 2020). Çalışma bulguları incelendiğinde, geliştirilen DKM/BAC kompozitlerinin pro-anjiyogenik etkinliğinin DKM grubuna kıyasla daha iyi olduğu belirlenmiştir. Bu büyük ölçüde artan BAC konsantrasyonlarında, zamana bağlı olarak ortama Si salımı ile ilişkilendirilmiştir

(Dashnyam vd. 2017). Bu bağlamda yüzde endotel filizlenme alanı verilerine göre DKM+%20 BAC kompozitlerinin içeriğindeki BAC konsantrasyonu ve buna bağlı olarak salınan Si iyonlarının pro-anjiyogenik özellikleri teşvik ettiği yönünde bir çıkarım yapılmıştır (Leu ve Leach 2008, Zhai vd. 2012, Paterson vd. 2020). Her ne kadar çalışma bulguları pro-anjiyogenik özellikler için olumlu yönde olsa da, çalışma kapsamında çekilen fotoğraflarda kompozitlerin arka plan kirliliğine yol açtığı gözlenmiştir. Yapılacak *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi bu noktada önem teşkil etmektedir. Bu durum göz önünde bulundurularak tez çalışmasında geliştirilen biyomalzemeler ile *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Çeşitli ilaç veya terapötik uyarı verebilen bileşiklerin, bununla beraber biyomalzemelerin anjiyogenik etkinliklerinin belirlenmesinde *in vitro*, *ex vivo* ve *in vivo* anjiyogenik modellerden faydalanılmaktadır. Her biri sunduğu avantaj ve dezavantajlar doğrultusunda tez kapsamında incelikte ele alınmıştır. Hücre kültürü uygulamaları esasına dayanan *in vitro* modellerin, doku ve organlardaki karmaşık anjiyogenez süreçlerini iyi karakterize edemediği sıkça ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra *in vitro* modellerin anjiyogenik nitelik belirleme çalışmalarında tek başına kullanımı yerine *ex vivo* ve *in vivo* modellerin de kullanımıyla desteklenmesi önemli bulunmaktadır. Bu durum dikkate alındığında *in vivo* modellerin kullanımı sürecin aydınlatılmasında daha açıklayıcı veriler sunmakla öne çıkmaktadır. İncelenen *in vivo* modeller arasında *ex ovo* Tavuk Embriyonik Koryoallantoik Membran çalışması ilaç/ilaç türevleri, biyomalzemeler ve bunların kombinasyonları için anjiyogenik etkinliğin araştırılmasında literatürde sıklıkla kullanımına başvurulmuş, ucuz, tekrarlanabilir bir yöntem olarak bildirilmektedir. Bununla birlikte embriyonik yapının hiçbir dış etken içermeyen kendi kendini idame ettirebilmesi ve yüksek verimli taramaya elverişli bir ortam sunması önemli bir etmendir. Bu sebeple tez kapsamında üretimi gerçekleştirilen DKM ve DKM/BAC kompozit biyomalzemelerin anjiyogenik özelliklerini belirlemek amacıyla *ex ovo* Tavuk Embriyonik Koryoallantoik Membran modeli kullanılmıştır. *In ovo* ve *ex ovo* Tavuk KAM modellerinin uygulama prosedürleri literatürde ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır (Ribatti vd. 2006, Mangir vd. 2019). Literatür örnekleri ile tez kapsamında gerçekleştirilen *ex ovo* tavuk KAM çalışması, mevcut laboratuvar ve gözlem koşulları dikkate alınarak iyi bir şekilde

optimize edilmiştir. *Ex ovo* model seçiminde embriyo ve ilişkili KAM yapısının anjiyogenik gözleme elverişli, daha geniş bir alan sunması etkili olmuştur. *Ex ovo* şartlarda uygun inkübasyon koşulları altında gelişimini sürdüren tavuk embriyolarının ilgili KAM dokusuna EG'nin 7. gününde biyomalzeme implantasyonu yapılmıştır. KAM modeli uygulamalarında EG 7'de malzeme implantasyonu, embriyolarda tam gelişmemiş bağışıklık sistemi, büyük damarlar arasında vaskülerizasyonun azlığı ve sağ kalım durumları gibi sebepler doğrultusunda kabul gören bir yaklaşımdır (Nowak-Sliwinska vd. 2018). Aynı zamanda implante edilen greftlerde damar edinimi doğrultusunda uygun mikro çevrenin sağlanmasına elverişli zaman noktasıdır. EG 12'de sonlandırılan KAM çalışmasında elde edilen fotoğraflar daha sonra çeşitli yazılımlar kullanılarak analiz edilmiştir. Analizde kullanılan Adobe Photoshop, ImageJ ve AngioTool gibi yazılımların bir arada kullanımı ile kantitatif verilerin eldesi mümkündür (Mangir vd. 2019). Tez çalışmasında kullanılan analiz yönteminin dışında başka filtre ve ölçüm teknikleri de KAM çalışmasında kullanılabilmektedir (Ryan vd. 2019). Tez kapsamında yukarıda belirtilen çeşitli yazılımların kullanımı ile analizler gerçekleştirilmiş fakat görüntülerin arka plan kirliliği sebebiyle Angiotool yazılımında hatalı veri eldesine neden olduğu görülmüştür. Bu noktada hizmet alımı yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Analiz bulguları incelendiğinde geliştirilen DKM, DKM+% 10 BAC ve DKM+% 20 BAC yapılarında artan BAC konsantrasyonları ile beraber anjiyogenik özelliklerin arttığı belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan kolajene ait damar yoğunluğu verileri DKM hidrojeline yakın sonuçlar sergilemekle beraber nispeten daha düşüktür. Yüzde damar yoğunluğu ve yüzde dallanma noktası verileri, DKM+% 20 BAC kompozitlerinin diğer gruplara kıyasla KAM dokusunda anjiyogenezi gözlenir ölçüde artırdığını göstermiştir. Buna ek olarak KAM dokusu ve ilişkili biyomalzeme çıkarılarak tespit sonrası kriyostat ile kesitleri alınmış ve alınan kesitlere H&E boyamaları yapılmıştır. H&E boyamaları uygulanan biyomalzemeler, yapılan anjiyogenik analiz verilerini destekler nitelikte bulgular sergilemiştir. Tüm biyomalzeme gruplarının KAM dokusu ile entegrasyonu doğrulanırken, hücre infiltrasyonu ve küçük kan damarlarının oluşumu gözlenmiştir. Buna ek olarak DKM+%20 BAC kompozitlerinin diğer gruplara kıyasla kan damarı oluşumu noktasında sergilediği olumlu etkiler, anjiyogenik özelliklerin teşvik edilmesi hususunda DKM+%20 BAC kompozitlerini ön plana çıkarmıştır.

Vasküler ağların oluşması ve anjiyogenez süreci embriyonik iskelet gelişimi, kemik büyümesi ve şekillenmesi için bir gerekliliktir. Temelde kemik kökenleri ile ilişkili olarak intramembranöz osifikasyon (kafatası, klavikula) ve endokondral osifikasyon (uzuvlar, omur ve kaburgalar) süreçlerinin her biri vasküler ağların gelişimi neticesinde biçimlenmektedir (Saran vd. 2014). Yapılan araştırmalar VEGF'e bağlı neovasküleratif uyarımın veya doğrudan kemik hücreleri üzerindeki etkisinin osifikasyonu büyük ölçüde destekleyebildiğini göstermiştir. BAC mikropartiküllerinin bu gibi büyüme faktörlerinin salımını artırarak fibroblast ve osteoblast hücreleri üzerinde doğrudan etkinlik gösterdiği belirtilmektedir. Bu etkinliğin büyük oranda BAC yüzeylerinden salınan iyonlar ile bağlantılı olarak hipoksik koşulların oluşturulması, buna ek olarak hidroksiapatit oluşumuyla osteoprogenitör hücrelerin uyarılarak hücre dışı matriks üretimi ile süregelen "anjiyogenik-osteojenik eşleşme" olarak adlandırılan ilişkilerin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Yang vd. 2012, Crush vd. 2021). Bu kapsamda tez çalışmasında anjiyogenik etkinliği çeşitli testler ile belirlenen DKM ve DKM/BAC kompozitlerinin osteogenez üzerindeki etkinliğini değerlendirmek amacıyla Osteogenez çalışması yapılmıştır. Geliştirilen malzemelerin implantasyonu yapılan *ex ovo* tavuk embriyonik KAM çalışmasının sonlandırılmasının ardından embriyoların alt uzuvlarında malzeme uygulaması ile endokondral osifikasyonun ne yönde etkilendiği araştırılmıştır. Araştırma bulguları incelendiğinde, DKM, DKM +%10 BAC ve DKM+20 BAC malzemelerin kontrol grubu olarak kullanılan kolajene kıyasla anlamlı ölçüde osifikasyonu artırdığı saptanmıştır. Gruplar içerisinde ise en belirgin fark kolajen ve DKM+ %20 BAC kompozitlerinde gözlenmiştir. Tez kapsamında yapılan diğer çalışmalar ile beraber osteogenez analizine ait bulgular incelendiğinde, DKM+ %20 BAC kompozitlerinin, anjiyogenik ve osteojenik özellikleri teşvik ettiği belirlenmiştir.

Özetle, bu tez çalışması kapsamında doğal ve sentetik biyomalzemelerin bir arada kullanımı ile yeni kompozit biyomalzemeler üretilmiştir. Geliştirilen biyomalzemelerin kimyasal ve fiziksel karakterizasyonları, bununla birlikte *in vitro* biyoaktivite ve biyouyumluluk çalışmaları, akabinde anjiyogenik ve osteojenik özelliklerinin incelendiği çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar geliştirilen biyomalzemelerin toksik etki göstermeden kontrollü olarak biyobozunarak anjiyogenik uyarım yapabildiğini göstermiştir. Tez kapsamında bu bağlamda en uygun adayın

DKM+%20 BAC kompoziti olduğuna karar verilmiştir. DKM+%20 BAC kompozitinin, doku mühendisliği uygulamalarında ana sınırlamalardan olan implante edilebilen biyomalzeme formundaki yapıların neovaskülerizasyonu yeterli ölçüde ve hızda başlatma kabiliyetleri noktasında potansiyel teşkil ettiği düşünülmektedir. Bununla birlikte rejenere dokulara implantasyonu ile beraber sağladığı anjiyogenik uyarım ile yenilenme ve fonksiyonların restorasyonuna izin verebileceği düşünülmektedir. Bu gibi durumlar dikkate alındığında çeşitli patolojilerin ve doku mühendisliği ürünlerinin temel problemi olan anjiyogenez eksikliğinde, geliştirilen kompozit biyomalzeme kullanımının faydalı olacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte farklı *in vivo* modellerde yumuşak ve sert doku ikâmesi olarak araştırılması çıkarımların desteklenmesi için önem arz etmektedir. Bu bağlamda gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalar ile, daha kapsamlı ve ayrıntılı bilgilerin edinimi söz konusu olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aguiar, H., Serra, J., González, P., & León, B. 2009. Structural study of sol–gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 355(8), 475-480.
- Auerbach, R., & Muthukkaruppan, V. 2012. The chick embryo aortic arch assay. In: *The Textbook of Angiogenesis and Lymphangiogenesis: Methods and Applications* (pp. 149-157). Springer, Dordrecht.
- Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L., & Akhtar, N. 2003. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clinical chemistry*, 49(1), 32-40.
- Auger, F. A., Gibot, L., & Lacroix, D. 2013. The pivotal role of vascularization in tissue engineering. *Annual review of biomedical engineering*, 15, 177-200.
- Baino, F., & Yamaguchi, S. 2020. The use of simulated body fluid (SBF) for assessing materials bioactivity in the context of tissue engineering: review and challenges. *Biomimetics*, 5(4), 57.
- Baino, F., Fiume, E., Miola, M., & Verné, E. 2018. Bioactive sol-gel glasses: processing, properties, and applications. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 15(4), 841-860.
- Boccaccini, A. R., & Ma, P. X. (Eds.). 2014. *Tissue engineering using ceramics and polymers*. Elsevier.
- Brightman, A. O., Rajwa, B. P., Sturgis, J. E., McCallister, M. E., Robinson, J. P., & Voytik-Harbin, S. L. 2000. Time-lapse confocal reflection microscopy of collagen fibrillogenesis and extracellular matrix assembly in vitro. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 54(3), 222-234.
- Briquez, P. S., Clegg, L. E., Martino, M. M., Mac Gabhann, F., & Hubbell, J. A. 2016. Design principles for therapeutic angiogenic materials. *Nature Reviews Materials*, 1(1), 1-15.
- Cacciotti, I., Lombardi, M., Bianco, A., Ravaglioli, A., & Montanaro, L. 2012. Sol–gel derived 45S5 bioglass: synthesis, microstructural evolution and thermal behaviour. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(8), 1849-1866.
- Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, 6(4), 389-395.
- Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*, 9(6), 653-660.
- Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932-936.

- Chen, W., Thein-Han, W., Weir, M. D., Chen, Q., & Xu, H. H. 2014. Prevascularization of biofunctional calcium phosphate cement for dental and craniofacial repairs. *Dental Materials*, 30(5), 535-544.
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12), 3233-3243.
- Crosby, C. O., & Zoldan, J. 2019. Mimicking the physical cues of the ECM in angiogenic biomaterials. *Regenerative biomaterials*, 6(2), 61-73.
- Crush, J., Hussain, A., Seah, K. T. M., & Khan, W. S. 2021. Bioactive Glass: Methods for Assessing Angiogenesis and Osteogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1523.
- Dashnyam, K., El-Fiqi, A., Buitrago, J. O., Perez, R. A., Knowles, J. C., & Kim, H. W. 2017. A mini review focused on the proangiogenic role of silicate ions released from silicon-containing biomaterials. *Journal of tissue engineering*, 8, 2041731417707339.
- Day, R. M. 2005. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue engineering*, 11(5-6), 768-777.
- De Jong, W. H., Carraway, J. W., & Geertsma, R. E. 2020. In vivo and in vitro testing for the biological safety evaluation of biomaterials and medical devices. In *Biocompatibility and performance of medical devices* (pp. 123-166). Woodhead Publishing.
- Dewavrin, J. Y., Hamzavi, N., Shim, V. P. W., & Raghunath, M. 2014. Tuning the architecture of three-dimensional collagen hydrogels by physiological macromolecular crowding. *Acta biomaterialia*, 10(10), 4351-4359.
- Douglas, T. E., Piwowarczyk, W., Pamula, E., Liskova, J., Schaubroeck, D., Leeuwenburgh, S. C., ... & Dubruel, P. 2014. Injectable self-gelling composites for bone tissue engineering based on gellan gum hydrogel enriched with different bioglasses. *Biomedical Materials*, 9(4), 045014.
- Durgalakshmi, D., Rakkesh, R. A., Aruna, P., Ganesan, S., & Balakumar, S. 2020. Bioactivity and hemocompatibility of sol-gel bioactive glass synthesized under different catalytic conditions. *New Journal of Chemistry*, 44(48), 21026-21037.
- Elçin, Y. M., Dixit, V., & Gitnick, G. 2001. Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. *Artificial organs*, 25(7), 558-565.
- Faulk, D. M., & Badylak, S. F. 2014. Natural biomaterials for regenerative medicine applications. *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*, 101-112.
- Fernández-Pérez, J., & Ahearne, M. 2019. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.

- Gaharwar, A. K., Peppas, N. A., & Khademhosseini, A. 2014. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Biotechnology and bioengineering*, 111(3), 441-453.
- Gao, L., Zhou, Y., Peng, J., Xu, C., Xu, Q., Xing, M., & Chang, J. 2019. A novel dual-adhesive and bioactive hydrogel activated by bioglass for wound healing. *NPG Asia Materials*, 11(1), 1-11.
- Gao, W., Jin, W., Li, Y., Wan, L., Wang, C., Lin, C., ... & Mao, C. 2017. A highly bioactive bone extracellular matrix-biomimetic nanofibrous system with rapid angiogenesis promotes diabetic wound healing. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(35), 7285-7296.
- Gerhardt, L. C., & Boccaccini, A. R. 2010. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*, 3(7), 3867-3910.
- Gerhardt, L. C., Widdows, K. L., Erol, M. M., Nandakumar, A., Roqan, I. S., Ansari, T., & Boccaccini, A. R. 2013. Neocellularization and neovascularization of nanosized bioactive glass-coated decellularized trabecular bone scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(3), 827-841.
- Gilpin, A., & Yang, Y. 2017. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *BioMed research international*, 2017, 9831534.
- Graham, J., Raghunath, M., & Vogel, V. 2019. Fibrillar fibronectin plays a key role as nucleator of collagen I polymerization during macromolecular crowding-enhanced matrix assembly. *Biomaterials science*, 7(11), 4519-4535.
- Gunatillake, P. A., & Adhikari, R. 2003. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 5(1), 1-16.
- Hall, H., Djonov, V., Ehrbar, M., Hoechli, M., & Hubbell, J. A. 2004. Heterophilic interactions between cell adhesion molecule L1 and α v β 3-integrin induce HUVEC process extension in vitro and angiogenesis in vivo. *Angiogenesis*, 7(3), 213-223.
- Hasirci, V., & Hasirci, N. 2018. Hemocompatibility. In *Fundamentals of Biomaterials* (pp. 173-186). Springer, New York, NY.
- Hench, L. L. 2006. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11), 967-978.
- Huang, J., & Best, S. M. 2022. Ceramic biomaterials for tissue engineering. *Tissue engineering using ceramics and polymers*, 3-40.
- Hulmes, D. J. S. 2008. Collagen diversity, synthesis and assembly. In *Collagen* (pp. 15-47). Springer, Boston, MA.
- Jones, J. R. 2013. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta biomaterialia*, 9(1), 4457-4486.

- Kapoor, A., Chen, C. G., & Iozzo, R. V. 2020. A simplified aortic ring assay: a useful ex vivo method to assess biochemical and functional parameters of angiogenesis. *Matrix Biology Plus*, 6, 100025.
- Kargozar, S., Baino, F., Lotfibakhshaiesh, N., Hill, R. G., Milan, P. B., Hamzehlou, S., ... & Mozafari, M. 2018. When size matters: Biological response to strontium- and cobalt-substituted bioactive glass particles. *Materials Today: Proceedings*, 5(7), 15768-15775.
- Kargozar, S., Ramakrishna, S., & Mozafari, M. 2019. Chemistry of biomaterials: Future prospects. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10, 181-190.
- Kaur, G., Pickrell, G., Sriranganathan, N., Kumar, V., & Homa, D. 2016. Review and the state of the art: sol-gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(6), 1248-1275.
- Keane, T. J., & Badylak, S. F. 2014. Biomaterials for tissue engineering applications. *Seminars in Pediatric Surgery*, 23(3), 112-118.
- Khademhosseini, A., & Langer, R. 2016. A decade of progress in tissue engineering. *Nature protocols*, 11(10), 1775-1781.)
- Khang, G., Lee, S. J., Kim, M. S., & Lee, H. B. 2006. Biomaterials: tissue engineering and scaffolds. *Encyclopedia of Medical devices and instrumentation*.
- Kim, B. S., Baez, C. E., & Atala, A. 2000. Biomaterials for tissue engineering. *World journal of urology*, 18(1), 2-9.
- Kokubo, T., & Takadama, H. 2006. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915.
- Kong, J., & Yu, S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.
- Laiva, A. L., O'Brien, F. J., & Keogh, M. B. 2018. Innovations in gene and growth factor delivery systems for diabetic wound healing. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 12(1), 296-312.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. 1993. Tissue engineering. *Science (New York, NY)*, 260(5110), 920-926.
- Laschke, M. W., & Menger, M. D. 2016. Prevascularization in tissue engineering: current concepts and future directions. *Biotechnology advances*, 34(2), 112-121.
- Laschke, M. W., Harder, Y., Amon, M., Martin, I., Farhadi, J., Ring, A., Torio-Padron, N., Schramm, R., Rücker, M., Junker, D., Häufel, J. M., Carvalho, C., Heberer, M., Germann, G., Vollmar, B., Menger, M. D. 2006. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue engineering*, 12(8), 2093-2104.

- Laschke, M. W., Vollmar, B., & Menger, M. D. 2009. Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 15(4), 455-465.
- Lee, J. H., Parthiban, P., Jin, G. Z., Knowles, J. C., & Kim, H. W. 2021. Materials roles for promoting angiogenesis in tissue regeneration. *Progress in Materials Science*, 117, 100732.
- Leu, A., & Leach, J. K. 2008. Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate. *Pharmaceutical research*, 25(5), 1222-1229.
- Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. 2015. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical reports*, 3(5), 617-620.
- Liu, W. C., Chen, S., Zheng, L., & Qin, L. 2017. Angiogenesis assays for the evaluation of angiogenic properties of orthopaedic biomaterials—A general review. *Advanced healthcare materials*, 6(5), 1600434.
- Loh, Q. L., & Choong, C. 2013. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 19(6), 485-502.
- Lucas-Girot, A., Mezahi, F. Z., Mami, M., Oudadesse, H., Harabi, A., & Le Floch, M. 2011. Sol-gel synthesis of a new composition of bioactive glass in the quaternary system $\text{SiO}_2\text{--CaO--Na}_2\text{O--P}_2\text{O}_5$: comparison with melting method. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 357(18), 3322-3327.
- Mangir, N., Eke, G., Hasirci, N., Chapple, C. R., Hasirci, V., & MacNeil, S. 2019. An estradiol releasing, proangiogenic hydrogel as a candidate material for use in soft tissue interposition. *Neurourology and urodynamics*, 38(5), 1195-1202.
- Mangir, N., Dikici, S., Claeysens, F., & MacNeil, S. 2019. Using ex ovo chick chorioallantoic membrane (CAM) assay to evaluate the biocompatibility and angiogenic response to biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(7), 3190-3200.
- Marelli, B., Ghezzi, C. E., Mohn, D., Stark, W. J., Barralet, J. E., Boccaccini, A. R., & Nazhat, S. N. 2011. Accelerated mineralization of dense collagen-nano bioactive glass hybrid gels increases scaffold stiffness and regulates osteoblastic function. *Biomaterials*, 32(34), 8915-8926.
- Mark, K., Park, J., Bauer, S., & Schmuki, P. 2010. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell and tissue research*, 339(1), 131-153.
- Mastrullo, V., Cathery, W., Velliou, E., Madeddu, P., & Campagnolo, P. 2020. Angiogenesis in tissue engineering: as nature intended?. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 188.
- Mehdizadeh, H., Sumo, S., Bayrak, E. S., Brey, E. M., & Cinar, A. 2013. Three-dimensional modeling of angiogenesis in porous biomaterial scaffolds. *Biomaterials*, 34(12), 2875-2887.

- Miguez-Pacheco, V., Hench, L. L., & Boccaccini, A. R. 2015. Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues. *Acta biomaterialia*, 13, 1-15.
- Miller, J. S., Shen, C. J., Legant, W. R., Baranski, J. D., Blakely, B. L., & Chen, C. S. 2010. Bioactive hydrogels made from step-growth derived PEG-peptide macromers. *Biomaterials*, 31(13), 3736-3743.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, D. I. 2008. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134-179.
- Naderi, H., Matin, M. M., & Bahrami, A. R. 2011. Critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *Journal of biomaterials applications*, 26(4), 383-417.
- Nicosia, R. F., Tcho, R., & Leighton, J. 1982. Histotypic angiogenesis in vitro: light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. *In vitro*, 18(6), 538-549.
- Nicosia, R. F., Zhu, W. H., Fogel, E., Howson, K. M., & Aplin, A. C. 2005. A new ex vivo model to study venous angiogenesis and arterio-venous anastomosis formation. *Journal of vascular research*, 42(2), 111-119.
- Nomi, M., Miyake, H., Sugita, Y., Fujisawa, M., & Soker, S. 2006. Role of growth factors and endothelial cells in therapeutic angiogenesis and tissue engineering. *Current stem cell research & therapy*, 1(3), 333-343.
- Norrby, K. 2006. In vivo models of angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10(3), 588-612.
- Nosrati, H., Pourmotabed, S., & Sharifi, E. 2018. A review on some natural biopolymers and their applications in angiogenesis and tissue engineering. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 5(3), 81-91.
- Novosel, E. C., Kleinhans, C., & Kluger, P. J. 2011. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 63(4-5), 300-311.
- Nowak-Sliwinska, P., Alitalo, K., Allen, E., Anisimov, A., Aplin, A. C., Auerbach, R., ... & Griffioen, A. W. 2018. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*, 21(3), 467-471.
- Ozturk, S., Ayanoğlu, F. B., Parmaksiz, M., Elçin, A. E., & Elçin, Y. M. 2020. Clinical and surgical aspects of medical materials' biocompatibility. In *Handbook of Biomaterials Biocompatibility* (pp. 219-250). Woodhead Publishing.
- Paik, K. J., Zielins, E. R., Atashroo, D. A., Maan, Z. N., Duscher, D., Luan, A., ... & Wan, D. C. 2015. Studies in fat grafting: part V. Cell-assisted lipotransfer to enhance fat graft retention is dose dependent. *Plastic and reconstructive surgery*, 136(1), 67.

- Parmaksiz, M., Dogan, A., Odabas, S., Elçin, A. E., & Elçin, Y. M. 2016. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomedical materials*, 11(2), 022003.
- Parmaksiz, M., Lalegül-Ülker, Ö., Vurat, M. T., Elçin, A. E., & Elçin, Y. M. 2021. Magneto-sensitive decellularized bone matrix with or without low frequency-pulsed electromagnetic field exposure for the healing of a critical-size bone defect. *Materials Science and Engineering: C*, 124, 112065.
- Paterson, T. E., Bari, A., Bullock, A. J., Turner, R., Montalbano, G., Fiorilli, S., ... & Shepherd, J. 2020. Multifunctional copper-containing mesoporous glass nanoparticles as antibacterial and proangiogenic agents for chronic wounds. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 246.
- Perez, R. A., Won, J. E., Knowles, J. C., & Kim, H. W. 2013. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Advanced drug delivery reviews*, 65(4), 471-496.
- Pina, S., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. 2015. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review. *Advanced Materials*, 27(7), 1143-1169.
- Pirayesh, H., & Nychka, J. A. 2013. Sol-gel synthesis of bioactive glass-ceramic 45S5 and its in vitro dissolution and mineralization behavior. *Journal of the American Ceramic Society*, 96(5), 1643-1650.
- Place, E. S., George, J. H., Williams, C. K., & Stevens, M. M. 2009. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chemical society reviews*, 38(4), 1139-1151.
- Pontremoli, C., Boffito, M., Fiorilli, S., Laurano, R., Torchio, A., Bari, A., ... & Vitale-Brovarone, C. 2018. Hybrid injectable platforms for the in situ delivery of therapeutic ions from mesoporous glasses. *Chemical engineering journal*, 340, 103-113.
- Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature medicine*, 9(6), 677-684.
- Qazi, T. H., Hafeez, S., Schmidt, J., Duda, G. N., Boccaccini, A. R., & Lippens, E. 2017. Comparison of the effects of 45S5 and 1393 bioactive glass microparticles on hMSC behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(10), 2772-2782.
- Qian, Q., Nath, K. A., Wu, Y., Daoud, T. M., & Sethi, S. 2010. Hemolysis and acute kidney failure. *American Journal of Kidney Diseases*, 56(4), 780-784.
- Quinlan, E., Partap, S., Azevedo, M. M., Jell, G., Stevens, M. M., & O'Brien, F. J. 2015. Hypoxia-mimicking bioactive glass/collagen glycosaminoglycan composite scaffolds to enhance angiogenesis and bone repair. *Biomaterials*, 52, 358-366.
- Rahaman, MN, Day, DE, Bal, BS, Fu, Q., Jung, SB, Bonewald, LF, & Tomsia, AP 2011. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 7(6), 2355-2373.

- Rashid, R., Lim, N. S. J., Chee, S. M. L., Png, S. N., Wohland, T., & Raghunath, M. 2014. Novel use for polyvinylpyrrolidone as a macromolecular crowder for enhanced extracellular matrix deposition and cell proliferation. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 20(12), 994-1002.
- Ren, X., Zhao, M., Lash, B., Martino, M. M., & Julier, Z. 2020. Growth factor engineering strategies for regenerative medicine applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 469.
- Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., & Presta, M. 2006. The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay. *Nature protocols*, 1(1), 85-91.
- Rouwkema, J., Rivron, N. C., & van Blitterswijk, C. A. 2008. Vascularization in tissue engineering. *Trends in biotechnology*, 26(8), 434-441.
- Ryan, E. J., Ryan, A. J., González-Vázquez, A., Philippart, A., Ciraldo, F. E., Hobbs, C., ... & O'Brien, F. J. 2019. Collagen scaffolds functionalised with copper-eluting bioactive glass reduce infection and enhance osteogenesis and angiogenesis both in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 197, 405-416.
- Saberianpour, S., Heidarzadeh, M., Geranmayeh, M. H., Hosseinkhani, H., Rahbarghazi, R., & Nouri, M. 2018. Tissue engineering strategies for the induction of angiogenesis using biomaterials. *Journal of biological engineering*, 12(1), 1-15.
- Saldin, L. T., Cramer, M. C., Velankar, S. S., White, L. J., & Badylak, S. F. 2017. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta biomaterialia*, 49, 1-15.
- Santos, M. I., & Reis, R. L. 2010. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromolecular bioscience*, 10(1), 12-27.
- Saran, U., Piperni, S. G., & Chatterjee, S. 2014. Role of angiogenesis in bone repair. *Archives of biochemistry and biophysics*, 561, 109-117.
- Sarker, B., Hum, J., Nazhat, S. N., & Boccaccini, A. R. 2015. Combining collagen and bioactive glasses for bone tissue engineering: A review. *Advanced healthcare materials*, 4(2), 176-194.
- Sarker, B., Li, W., Zheng, K., Detsch, R., & Boccaccini, A. R. 2016. Designing porous bone tissue engineering scaffolds with enhanced mechanical properties from composite hydrogels composed of modified alginate, gelatin, and bioactive glass. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2(12), 2240-2254.
- Sasagawa, T., Shimizu, T., Yamato, M., & Okano, T. 2016. Endothelial colony-forming cells for preparing prevascular three-dimensional cell-dense tissues using cell-sheet engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 10(9), 739-747.

- Sawkins, M. J., Bowen, W., Dhadda, P., Markides, H., Sidney, L. E., Taylor, A. J., ... & White, L. J. 2013. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta biomaterialia*, 9(8), 7865-7873.
- Senger, D. R., & Davis, G. E. 2011. Angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(8), a005090.
- Stang, K., Krajewski, S., Neumann, B., Kurz, J., Post, M., Stoppelkamp, S., ... & Walker, T. 2014. Hemocompatibility testing according to ISO 10993-4: Discrimination between pyrogen-and device-induced hemostatic activation. *Materials Science and Engineering: C*, 42, 422-428.
- Staton, C. A., Reed, M. W., & Brown, N. J. 2009. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International journal of experimental pathology*, 90(3), 195-221.
- Tibbitt, M. W., & Anseth, K. S. 2009. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 103(4), 655-663.
- Touri, R., Moztafzadeh, F., Sadeghian, Z., Bizari, D., Tahriri, M., & Mozafari, M. 2013. The use of carbon nanotubes to reinforce 45S5 bioglass-based scaffolds for tissue engineering applications. *BioMed research international*, 2013, 465086.
- Unger, R. E., Dohle, E., & Kirkpatrick, C. J. 2015. Improving vascularization of engineered bone through the generation of pro-angiogenic effects in co-culture systems. *Advanced drug delivery reviews*, 94, 116-125.
- Vacanti, C. A. 2006. The history of tissue engineering. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10(3), 569-576.
- Vafa, E., Bazargan-Lari, R., & Bahrololoom, M. E. 2021. Synthesis of 45S5 bioactive glass-ceramic using the sol-gel method, catalyzed by low concentration acetic acid extracted from homemade vinegar. *Journal of Materials Research and Technology*, 10, 1427-1436.
- van Nieuw Amerongen, G. P., Koolwijk, P., Versteilen, A., & van Hinsbergh, V. W. 2003. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(2), 211-217.
- Vargas, G. E., Durand, L. A. H., Cadena, V., Romero, M., Mesones, R. V., Mačković, M., ... & Gorustovich, A. A. 2013. Effect of nano-sized bioactive glass particles on the angiogenic properties of collagen based composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(5), 1261-1269.
- Vats, A., Tolley, N. S., Polak, J. M., & Gough, J. E. 2003. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 28(3), 165-172.

- Wang, Z., Wang, Z., Lu, W. W., Zhen, W., Yang, D., & Peng, S. 2017. Novel biomaterial strategies for controlled growth factor delivery for biomedical applications. *NPG Asia Materials*, 9(10), e435-e435.
- Weber, M., Steinle, H., Golombek, S., Hann, L., Schlensak, C., Wendel, H. P., & Avci-Adali, M. 2018. Blood-contacting biomaterials: in vitro evaluation of the hemocompatibility. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 99.
- Wu, J., Zheng, K., Huang, X., Liu, J., Liu, H., Boccaccini, A. R., ... & Shao, Z. 2019. Thermally triggered injectable chitosan/silk fibroin/bioactive glass nanoparticle hydrogels for in-situ bone formation in rat calvarial bone defects. *Acta biomaterialia*, 91, 60-71.
- Yang, J. L., Yao, X., Qing, Q., Zhang, Y., Jiang, Y. L., Ning, L. J., ... & Qin, T. W. 2018. An engineered tendon/ligament bioscaffold derived from decellularized and demineralized cortical bone matrix. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(2), 468-478.
- Yang, J., Zhou, W., Zheng, W., Ma, Y., Lin, L., Tang, T., ... & Hu, J. 2007. Effects of myocardial transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growth factor for the improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction. *Cardiology*, 107(1), 17-29.
- Yang, Y. Q., Tan, Y. Y., Wong, R., Wenden, A., Zhang, L. K., & Rabie, A. B. M. 2012. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *International journal of oral science*, 4(2), 64-68.
- Yu, H., Peng, J., Xu, Y., Chang, J., & Li, H. 2016. Bioglass activated skin tissue engineering constructs for wound healing. *ACS applied materials & interfaces*, 8(1), 703-715.
- Zeimaran, E., Pourshahrestani, S., Fathi, A., bin Abd Razak, N. A., Kadri, N. A., Sheikhi, A., & Bairo, F. 2021. Advances in bioactive glass-containing injectable hydrogel biomaterials for tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 136, 1-36.
- Zhai, W., Lu, H., Chen, L., Lin, X., Huang, Y., Dai, K., ... & Chang, J. 2012. Silicate bioceramics induce angiogenesis during bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 8(1), 341-349.
- Zhao, Z., Vizetto-Duarte, C., Moay, Z. K., Setyawati, M. I., Rakshit, M., Kathawala, M. H., & Ng, K. W. 2020. Composite hydrogels in three-dimensional in vitro models. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 611.
- Zheng, K., Solodovnyk, A., Li, W., Goudouri, O. M., Stähli, C., Nazhat, S. N., & Boccaccini, A. R. 2015. Aging time and temperature effects on the structure and bioactivity of gel-derived 45S5 glass-ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, 98(1), 30-38.

Zhou, L., Fan, L., Zhang, F. M., Jiang, Y., Cai, M., Dai, C., ... & Tan, G. X. 2021. Hybrid gelatin/oxidized chondroitin sulfate hydrogels incorporating bioactive glass nanoparticles with enhanced mechanical properties, mineralization, and osteogenic differentiation. *Bioactive materials*, 6(3), 890-904.

